

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

GABRIELA BONFIM RIBEIRO

SUCESSO REPRODUTIVO EM PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE) NA  
MATA ATLÂNTICA

CURITIBA

2021

GABRIELA BONFIM RIBEIRO

SUCESSO REPRODUTIVO EM PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE) NA  
MATA ATLÂNTICA

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Botânica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Botânica.

Orientadora: Profa. Dra. Viviane da Silva-Pereira

Coorientadora: Profa. Dra. Erika Amano

CURITIBA

2021

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas  
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Ribeiro, Gabriela Bonfim  
Sucesso reprodutivo em Pleurothallidinae (Orchidaceae) na Mata Atlântica. / Gabriela Bonfim Ribeiro. – Curitiba, 2021.  
56 p.: il.

Orientadora: Viviane da Silva-Pereira.  
Coorientadora: Erika Amano.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

1. Polinização - Mata Atlântica. 2. Orquídea. 3. Plantas - Reprodução. I. Título. II. Silva-Pereira, Viviane da. III. Amano, Erika, 1978-. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Botânica.

CDD (22. ed.) 584.4



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO BOTÂNICA -  
40001016004P9

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em BOTÂNICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de GABRIELA BONFIM RIBEIRO intitulada: **SUCESSO REPRODUTIVO DE PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE) NA MATA ATLÂNTICA**, sob orientação da Profa. Dra. VIVIANE DA SILVA PEREIRA, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua **APROVAÇÃO** no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 31 de Março de 2021.

Assinatura Eletrônica

05/04/2021 13:49:31.0

VIVIANE DA SILVA PEREIRA

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

13/04/2021 18:02:55.0

CARLA ADRIANE ROYER

Avallador Externo (null)

Assinatura Eletrônica

05/04/2021 11:39:03.0

ISABELA GALARDA VARASSIN

Avallador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Nossa Senhora e a todos os meus intercessores, que são os únicos que conhecem cada detalhe do caminho percorrido até aqui.

Dedicado à minha amada avó Ana Rita Pereira Bonfim (☆ 28/10/1933 † 18/03/2021)

\*\*\*

Em um trabalho denso, realmente são muitos os colaboradores que se envolvem na realização. Por isso, de antemão, agradeço a cada um que contribuiu mesmo que minimamente para que esse trabalho fosse concretizado. Contudo, junto a mim, alguns foram protagonistas e coadjuvantes importantes, que sempre levarei em minhas memórias por mais que o tempo passe.

Em primeiro lugar, a minha amada família, Gisele Bonfim Ribeiro Bertoldi, José Odival Ribeiro, Marcos Bertoldi e a mais nova integrante da família Laura Ribeiro Bertoldi, amada sobrinha e afilhada. Incluo e destaco meu doce e compreensivo namorado Jefferson Celli Honório. Obrigada pelo apoio meus amados. Vocês são um presente em minha vida. Mesmo meus cãezinhos, Malu e Pompom, pareciam entender e dar forças em todos os momentos que eu precisei. Nesse agradecimento destaco principalmente a minha **amada mãe**, Joceli Bonfim Ribeiro, para que seu nome, minha maravilhosa mãe, fique registrado a todos que tenho **a melhor, mais compreensiva e amiga mãe de todo o mundo!**

Agradeço a Dra. Viviane da Silva-Pereira por ter dado o seu sim à minha orientação e a Dra. Érika Amano por ter me permitido acompanhá-la em suas aulas de docência. Vocês contribuíram muito para a minha maturidade pessoal e profissional. Ao Dr. Eric de Camargo Smidt por todo o suporte na filogenia e na construção da árvore filogenética das espécies. Obrigada.

Agradeço aos discentes da botânica e em especial aos amigos do Laboratório de Sistemática e Ecologia Molecular de Plantas, Ana Lucia, Murilo Menck, Robin Hilário, André Lucas e Luan (agregado às vezes no laboratório), compartilhamos momentos de concentração e descontração. Além desses, destaco nomes muito importantes aqui. As “Anas” da minha vida, especialmente. A minha amiga, parceira de campo e “professora” Ana Paula Cardozo. Nossas histórias de campo estarão para sempre em minha memória. A Anna Victoria Silvério Righetto Mauad, por ter sido uma colaboradora tão importante

e auxiliado para que esse projeto de fato se concretizasse. A pós-doutoranda Camila Silveira Souza, por todo o suporte e auxílio no momento que precisei muito. Ao amigo Giovane Proença, por todos os esclarecimentos e ajuda na identificação e ensinamento sobre micro-orquídeas.

Agradeço ao pessoal que esteve nos árduos e satisfatórios trabalhos em campo. Obrigada a Daniela Imig por ter indicado os melhores assistentes da Uniandrade. Destaco especialmente o querido “Aren” por toda a sua ajuda. Muitos passaram como auxiliares nas trilhas da Guaricana e agradeço a cada um que dedicou seu tempo e esforço: Michelle, Isabella, Carla, Ethieny, Dyonathan, Maria Eduarda, Lucas, Eliel, Murilo, Ana Lucia, Jefferson, Joceli e José. Para que esse trabalho fosse possível, gentilmente Giácomo Clausi concedeu o acesso a Reserva e sempre os caseiros, Magaiver e Pedro, foram nossos guias independente se eram dias de chuva ou sol. Esses momentos em campo **PARA SEMPRE** estarão no meu coração. E espero, sinceramente, que as futuras gerações tenham o privilégio de registrar tudo o que os nossos olhos registraram.

Agradeço as conversas e diálogos com minha amiga querida Ethieny Meni Rodrigues e por ter atendido e entendido todos os momentos em que precisei de conselhos. Assim como, minha psicóloga Anne Caroline Kaminski Ortiz que ajudou a me preparar para todos os momentos. A todos que de alguma forma (amigos pessoais e do meio acadêmico) que ouviram meus desabafos e compartilharam alegrias.

Às minhas sempre melhores amigas Amanda Garanhani, Caroline Sales Marques, Isabella Cristina da Silva e minha linda afilhadinha Victoria Sommer Ferreira da Silva. Obrigada por tudo minhas verdadeiras irmãs!

Por fim, agradeço a quem dedicou o seu tempo lendo e avaliando meu trabalho. Espero, sinceramente, que seja de grande contribuição científica.

*“No fim tudo dá certo, se ainda não deu certo é porque ainda não chegou ao fim.”*

Fernando Sabino

## RESUMO

A polinização por engodo em orquídeas geralmente leva a baixa frequência de visitas de polinizadores e a redução da frutificação em populações naturais. Pleurothallidinae apresenta adaptações florais relacionadas à polinização por moscas. Combinações de atrações florais, como cor, perfume e secreções, podem resultar em características miófilas e sapromiófilas. No entanto, ainda não está claro se eles devem ser reconhecidos como um sistema de polinização completamente enganoso e quais características florais atraentes e padrões de floração podem favorecer o sucesso reprodutivo masculino e feminino em ambas as síndromes de polinização em condições naturais. Este estudo se propôs a investigar o efeito das diferentes estratégias reprodutivas, sendo elas: coloração do labelo, presença proteínas e amido, abertura e disposição floral e padrão temporal de floração no sucesso reprodutivo, em populações naturais de espécies de Pleurothallidinae, ocorrentes da Mata Atlântica. Neste trabalho foram estudados 448 indivíduos pertencentes a 17 espécies. Os indivíduos foram marcados e monitorados mensalmente para a observação do processo fenológico da reprodução, sucesso reprodutivo e eventuais atividades de visitantes florais. Flores frescas foram submetidas a testes histoquímicos, os quais indicaram a presença de osmóforos em pelo menos uma peça floral de todas as espécies, onze apresentaram proteínas e doze secreção de amido, os quais indicaram ter forte relação com o sucesso reprodutivo. As características miófilas influenciaram positivamente na função masculina, enquanto as características sapromiófilas influenciaram na função feminina.

**Palavras-chave:** Atratividade floral; polinização por engodo; miofilia; sapromiofilia; secreção de amido; secreção de proteínas.



## ABSTRACT

Deceit pollination in orchids usually leads to low frequency of pollinator visits and reduced fruit set in natural populations. Pleurothallidinae presents floral adaptations related to pollination by flies. Combinations of floral attractions as colour, odour and secretions, may result in myophilic and sapromyophilic pollination syndromes. However, it remains unclear whether they should be recognised as a completely deceptive pollination system and which attractive floral traits and flowering patterns may favour the male and female reproductive success on both pollination syndromes in natural conditions. This study aimed to investigate the effect of different reproductive strategies, being them: lip's color, presence of proteins and starch, opening and floral arrangement and temporal flowering pattern in the reproductive success, in natural populations of species of Pleurothallidinae, occurring in the Atlantic Forest. In this work, 448 individuals belonging to 17 species were studied. The individuals were marked and monitored monthly to observe the phenological process of reproduction, reproductive success and eventually the activity of floral visitors. Fresh flowers were subjected to histochemical tests, which indicated the presence of osmophores in at least one floral piece of all species, eleven presented proteins and twelve secretion of starch, which indicated having a strong relationship with reproductive success. Myophilic characteristics influenced positively on male function, while sapromiophily characteristics influenced female function.

**Keywords:** Floral attractiveness; deceptive pollination; myophily; sapromiophily; secretion of starch; secretion of protein.

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>8</b>
Quais estratégias reprodutivas influenciam positivamente o sucesso reprodutivo feminino e masculino em Pleurothallidinae (Orchidaceae)? .....	14
Resumo .....	15
Introdução .....	16
Material e métodos .....	19
Área de estudo .....	19
Espécies estudadas .....	20
Recursos, fenologia e sucesso reprodutivo .....	21
Análises .....	22
Resultados .....	23
Recursos, fenologia e sucesso reprodutivo .....	23
Análises .....	26
Discussão .....	29
Recursos, fenologia e sucesso reprodutivo .....	29
Referências .....	34
Material suplementar .....	41
<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>48</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

Para grande parte das angiospermas, o sucesso reprodutivo é intimamente influenciado pelas interações mutualísticas existentes com os polinizadores bióticos (Morellato & Leitão Filho, 1992; Rech *et al.* 2014). Como forma de maximizar essas interações, ao decorrer da evolução, diferentes especializações nos sistemas de polinização surgiram e estratégias reprodutivas foram ajustadas nas flores, para maior atratividade dos polinizadores resultando em maior eficiência na polinização e consequentemente maior sucesso de reprodução das espécies (Johnson e Steiner, 2000).

A família Orchidaceae possui 27.801 espécies (The Plant List, 2013) com ampla distribuição, especialmente nas regiões tropicais. Em diversas espécies de orquídeas, as especializações nos sistemas de polinização restringem a interação com polinizadores generalistas e ocasiona baixas taxas de polinização, o que influencia diretamente o baixo sucesso reprodutivo das espécies da família (Ackerman & Montalvo, 1990; Fritz & Nilsson, 1996; Ackerman e Zimmerman, 1993; Neiland & Wilckock, 1998; Tremblay *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2016). Diversos polinizadores foram registrados em orquídeas, como: pássaros, borboletas, mariposas, abelhas, besouros, formigas e moscas (Ackerman, 1986). Para que haja visitação em suas flores, as orquídeas podem oferecer recompensas florais aos seus polinizadores como néctar, óleos, exsudados florais e local de oviposição tendo em troca a polinização entre seus indivíduos. No entanto, dentro da família, há registros de espécies que não oferecem nenhuma recompensa floral para o polinizador, pois não produzem recursos (Dressler, 1981).

A falta de recursos florais foi descoberta por Sprengel (1793), que observando uma espécie de *Orchis* (L.) constatou a ausência de néctar por parte da planta. Depois disso, outros trabalhos (Pouyanne, 1917; Coleman & Pouyanne, 1927; Faegri & Van Der Pijl, 1979), corroboram o achado de Sprengel (Schiestl, 2005). A polinização por engodo é um tipo sofisticado de mimetismo floral onde as espécies atraem os polinizadores por meio da simulação de recursos. O tipo mais comum é o engodo alimentar (Galizia *et al.*, 2005; Smidt *et al.*, 2006, Silva-Pereira *et al.*, 2007; Endara *et al.*, 2010; Juillet *et al.*, 2007; Johnson, 1994; Aguiar *et al.*, 2018), seguido de engodo sexual, onde as flores mimetizam as parceiras de insetos para a cópula (Peakall, 1993; Francisco & Ascensão, 2013), local de abrigo (Jersáková *et al.*, 2006) e oviposição (Stökl *et al.*, 2011). Em espécies polinizadas por engodo os sinais visuais e sinais olfativos são grandes responsáveis pela atração de visitantes florais e alcance do sucesso de polinização (Salzmann *et al.*, 2008;

Dormont *et al.*, 2010; Streinzer *et al.*, 2009; Papadoulos *et al.*, 2013). No entanto, algumas espécies têm demonstrado um sistema de polinização não completamente enganoso, onde pequenas quantidades de recursos são oferecidas com a principal finalidade de atração e indução de maior tempo de forrageamento do polinizador na flor (Bogarín *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2020).

Em um experimento com *B. robertiana*, foi comparado o sucesso reprodutivo masculino a partir da suplementação de néctar em algumas flores. Nas plantas com suplementação ocorreu menor remoção de polinário do que nas plantas controle. Concluiu-se que a escassez de recursos provocava um comportamento investigativo dos polinizadores que passavam mais tempo forrageando às flores e como consequência removiam o polinário (Smithson & Gigord, 2001).

Recentemente, a secreção de proteínas foi descrita para micro-orquídeas miófilas do gênero *Bulbophyllum* Thouars, e relatada em algumas espécies da subtribo Pleurothallidinae, *Trichosalpinx blaisdellii* (S. Watson) Luer e *T. reflexa* Mel. Fernández & Bogarín (Bogarín *et al.*, 2018). Foi observado que essas orquídeas são polinizadas por moscas fêmeas e a coleta de proteínas ocorre para a produção de ovos (Davies & Stpiczynska, 2014). No entanto, as quantidades secretadas desse recurso são escassas e seriam insuficientes para essa finalidade. Portanto, ocorre a polinização por engodo, uma vez que, a quantidade secretada não supre a necessidade do polinizador, apenas atrai e provoca maior tempo de forrageamento (Davies & Stpiczynska, 2012; Bogarín *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2020).

Indivíduos próximos de plantas polinizadas por engodo tendem a ter menor sucesso reprodutivo, pois os polinizadores enganados voam a maiores distâncias após descobrirem a falta de recurso e evitam visitas sucessivas em flores próximas, resultando em baixo sucesso reprodutivo para as populações. Em contraste, ocorre maior fluxo gênico entre indivíduos distantes (Nilsson, 1992; Jersáková *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2010).

Para ser mais atrativa e aumentar as chances de serem mais visitadas, algumas estratégias são descritas em plantas polinizadas por engodo (Heinrich, 1975; Parra-Tabla & Vargas, 2004, Sun *et al.*, 2017) Tais estratégias incluem: a fenologia da floração (Parra-Tabla *et al.*, 2004), a disposição das flores, únicas e múltiplas nas inflorescências (Sun *et al.*, 2017), o *display floral* (quantidade de flores abertas) composto de muitas flores (Li *et al.*, 2011), a emissão de perfumes e feromônios (Grajales-Conesa *et al.*, 2011; Cardoso-Gustavson *et al.*, 2017), a coloração das peças florais (Schoen & Clegg, 1985; Gasket,

2012), a altura da planta (Peakall & Handell, 1993) e a posição e tamanho das flores nas inflorescências (Kindlmann & Jesáková, 2005; Tremblay, 2006). Essas características resultam em maior atratividade e consequentemente mais visitas. Sendo a planta mais atrativa há maiores chances de que ocorra frutificação para as espécies (Fritz & Nilsson, 1996).

#### *Sucesso reprodutivo masculino e sucesso reprodutivo feminino*

Em orquídeas as estruturas femininas e masculinas são fundidas na região central da flor em uma única estrutura, a coluna (Cozzolino & Widmer, 2005). O sucesso reprodutivo masculino é facilmente mensurável por meio da inspeção minuciosa da antera da flor, onde constará a ausência ou presença do polinário e, o sucesso reprodutivo feminino, pode ser medido por meio da formação de frutos. (Li *et al.*, 2011; Sletvold & Agren; 2011; Gross & Schiestl, 2015).

As estratégias reprodutivas diferem em relação à função masculina e feminina. Características como *display floral*, morfologia das flores e coloração são exemplos de como a seleção natural atua na efetividade do sucesso reprodutivo para as funções (Ehlers 2002; Pellegrino *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2011; Tremblay 2006; Capó *et al.*, 2019). Em estudos com *Dactylorhiza sambucina* (L.) Soó, o sucesso reprodutivo feminino e masculino não ocorreu quando os indivíduos se encontravam agregados espacialmente (Internicola *et al.*, 2006). Porém, quando suplementada com néctar artificial, o sucesso reprodutivo feminino foi afetado positivamente (Jesáková *et al.*, 2008). *Phaius delavayi* (Finet) P. J. Cribb & Perner, teve sucesso reprodutivo masculino positivamente correlacionado com o *display floral* (Li *et al.*, 2011). Em espécies secretoras de recursos, as flores do gênero *Sirindhornia* H.A.Pedersen & Suksathan foram influenciadas positivamente no sucesso reprodutivo feminino e masculino para a posição da flor na inflorescência (Srimuang *et al.*, 2010). As flores mais altas com *display floral* vistoso de *Malaxis monophyllos* (L.) Sw. e *Platanthera bifolia* (L.) Rich garantiram maior sucesso reprodutivo para os táxons (Jermacowicz *et al.*, 2015; Trunschke e Agren, 2019).

### *Floração em plantas enganosas*

O *display floral* é um dos sinais visuais mais importantes para a atração de polinizadores (Kindlmann & Jersáková, 2006). Em flores polinizadas por engodo, esse sinal pode ser determinante, transmitindo a ideia de mais recompensas e induzindo a visita (Sun *et al.*, 2017). A quantidade de frutos está positivamente relacionada com a quantidade de flores, quando o indivíduo produz grandes inflorescências (Schemske, 1980). No entanto, quando produz uma única flor pode sofrer limitação de pólen e falha na frutificação, pois o polinizador perde o interesse após algumas visitas resultando em menor sucesso reprodutivo quando comparadas a flores dispostas em inflorescências (Abeli *et al.*, 2013; Sun *et al.*, 2017).

Sun *et al.*, (2017) confirmou em cinco espécies de orquídeas que flores únicas tendem a experimentar menor sucesso reprodutivo quando comparadas às flores múltiplas. As hipóteses que os autores levantaram para descrever as vantagens que flores únicas têm para compensar o menor sucesso reprodutivo são, floração frequente durante a ano e precoce em relação ao pico de floração da comunidade, maior qualidade na produção de sementes e dispersão do pólen a longas distâncias (Tremblay *et al.*, 2005).

### *Polinização por moscas: miofilia e sapromiofilia*

Chama-se de miofilia a síndrome de polinização realizada por moscas. Inserida na miofilia está a sapromiofilia que a polinização realizada por moscas parasitas e decompositoras (Faegri & Van Der Pijl, 1979). Em Pleurothallidinae, a polinização por engodo é a síndrome de polinização generalizada sendo os insetos da Ordem Diptera os maiores agentes polinizadores (Pridgeon, 2001; Karremans & Diaz-Morales, 2019). As moscas são atraídas para as flores através da emissão de voláteis específicos que funcionam como semioquímicos e direcionam o polinizador até o recurso ou onde o mesmo é mimetizado, resultando no contato com as estruturas reprodutivas e efetivando a polinização (Millner & Baldwin, 2016).

Para a atração dos polinizadores, às flores de Pleurothallidinae, apresentam a combinação de características que formam padrões e atraem polinizadores específicos (Bogarín *et al.*, 2018). Os padrões são constituídos de características miófilas quando as flores apresentam presença ou ausência de recursos, cores amarelas e amarelas-esverdeadas particularmente na região do labelo, ornamentações no labelo e guias de néctar (Borba *et al.*, 2010; Cardoso-Gustavson *et al.*, 2017). E características

sapromiófilas, quando as flores apresentam ausência de recurso, perfumes e cor roxa particularmente na região do labelo que lembra matéria orgânica em decomposição (Bogarín *et al.*, 2018; Arévalo-Rodrigues *et al.*, 2021).

#### *Subtribo Pleurothallidinae*

Pleurothallidinae é uma subtribo dentro de Orchidaceae pertencente à tribo Epidendreae e subfamília Epidendroidae. Constituída por 44 gêneros e cerca de 5100 espécies, a subtribo representa cerca de 20% de toda a família Orchidaceae (Pridgeon 2001; Karremans, 2016; Bogarín *et al.*, 2019). Como o restante da família, as especificidades nos sistemas de polinização de Pleurothallidinae resultam em baixa taxa de sucesso reprodutivo para o grupo (Tremblay, 2006; Caradonna & Ackerman., 2010).

A polinização por engodo é predominante na subtribo, com os insetos da Ordem Diptera como os principais agentes polinizadores (Pridgeon *et al.*, 2001; Karremans & Dias-Morález, 2019). O grupo dos Diptera já foi considerado promíscuo e ineficiente para a polinização (Christensen, 1994; Barbosa *et al.*, 2009), entretanto, observações mais aprofundadas averiguaram que os sistemas de polinização descritos entre as moscas e as flores são complexos e especializados (Borba & Semir, 2001; Barbosa *et al.*, 2009, Pansarin *et al.*, 2016).

Para as espécies da subtribo, além do engodo alimentar, também foram descritos o engodo sexual (Blanco & Barboza, 2005), secreção de néctar (Singer & Coccuci, 1999; Albores-Ortiz & Sosa, 2006; Barbosa *et al.*, 2009; Karremans *et al.*, 2015; Pansarin *et al.*, 2016) e de outros recursos sinalizadores (Bogarín *et al.*, 2018). São complexos os sistemas de polinização dentro da subtribo (Blanco & Barboza, 2005; Endara *et al.*, 2010; Karremans *et al.*, 2015; Policha *et al.*, 2016; Bogarín *et al.*, 2018). Um exemplo é o gênero *Acianthera* Sw., com sistema de polinização recompensador e polinizado por engodo e fraudulento. As espécies polinizadas por moscas da família Phoridae secretam néctar e as polinizadas por Chloropidae não possuem recursos (Singer & Coccuci, 1999; Borba & Semir, 2001; Melo *et al.*, 2010).

No Bioma Mata Atlântica, local importante para o surgimento e diversificação da subtribo (Morales *et al.*, 2020), somam-se mais de 200 espécies de Pleurothallidinae, representando 15% da família Orchidaceae e indicando riqueza e diversidade dos representantes nesse Bioma (Stehmann, *et al.*, 2009). Dessa maneira, esse trabalho visa monitorar e descrever as estratégias reprodutivas em espécies de Pleurothallidinae na

Mata Atlântica. Mais especificamente, visa investigar o efeito da coloração do labelo, “recursos sinalizadores” (proteínas e amido), produção de flores, *display floral* e duração da floração.



**Quais estratégias reprodutivas influenciam positivamente o sucesso reprodutivo feminino e masculino em Pleurothallidinae (Orchidaceae)?**

Gabriela Bonfim Ribeiro<sup>a</sup> (<https://orcid.org/0000-0002-1114-8508>), Anna Victoria Silvério Righetto Mauad<sup>b</sup> (ORCID 0000-0002-4821-9138), Camila Silveira Souza<sup>a</sup> (ORCID [orcid.org/0000-0003-0856-9392](https://orcid.org/0000-0003-0856-9392)), Erika Amano<sup>a</sup> (ORCID 0000-0002-4292-3087), Eric de Camargo Smidt<sup>a</sup> (ORCID 0000-0002-1177-1682), Viviane Silva-Pereira<sup>a</sup> (ORCID 0000-0003-4543-178X)

<sup>a</sup>*Programa de Pós-Graduação em Botânica, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Caixa Postal 19031, 81530-900, Curitiba, Paraná, Brazil*

<sup>b</sup>*Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Departamento de Botânica, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Caixa Postal 19031, 81530-900, Curitiba, Paraná, Brazil*

*Contact: Dra Viviane Silva-Pereira/ [visilvapereira@gmail.com](mailto:visilvapereira@gmail.com)*

Manuscrito formatado de acordo com as normas da revista Plant Biology. eISSN: 1438-8677 (<https://onlinelibrary.wiley.com/journal/14388677>)

## Resumo

- A polinização por engodo em orquídeas geralmente leva a baixa frequência de visitas de polinizadores e a redução da frutificação em populações naturais. Pleurothallidinae apresenta adaptações florais relacionadas à polinização por moscas. Combinações de atrações florais, como cor, perfume e secreções, podem resultar em características miófilas e sapromiófilas. No entanto, ainda não está claro se eles devem ser reconhecidos como um sistema de polinização completamente enganoso e quais características florais atraentes e padrões de floração podem favorecer o sucesso reprodutivo masculino e feminino em ambas as síndromes de polinização em condições naturais.
- Nós investigamos o efeito da cor do labelo, presença de proteínas e secreção de amido, produção floral, tipo de *display floral* e duração do período de floração na porcentagem de remoção de polinário (PPR) e porcentagem de frutificação (PPS) em populações naturais de 17 espécies de Pleurothallidinae. Realizamos a análise de Contrastes Filogeneticamente Independentes (PIC) para testar a independência das características e a análise do Modelo Linear Generalizado (GLM) para testar se o PPR e PTF são afetados por características florais e período de floração.
- Nossos resultados sugerem que diferentes combinações de atributos histoquímicos e cores do labelo desempenham um papel importante para a aptidão reprodutiva masculina e feminina. A presença de proteínas e a cor amarela-esverdeada influenciaram o sucesso reprodutivo masculino e o labelo roxo influenciou no sucesso reprodutivo feminino. A produção floral total parece aumentar a remoção de polinários, mas não a frutificação, enquanto um período de floração mais longo aumenta as chances de as funções masculinas e femininas alcançarem maior sucesso reprodutivo.
- Em conclusão, características miófilas influenciaram o sucesso reprodutivo masculino, enquanto características sapromiófilas podem fornecer vantagens reprodutivas em relação ao sucesso reprodutivo feminino em Pleurothallidinae.
- **Palavras-chave:** Atratividade floral; conjunto de frutos; miofilia; produção de flores; secreção de amido; secreção de proteínas.
- **Resumo de mensagem:** O sucesso reprodutivo de machos e fêmeas é favorecido por distintos traços atrativos florais e de floração em espécies miófilas e sapromiófilas de Pleurothallidinae (Orchidaceae).

## Introdução

Diversas espécies vegetais alogâmicas dependem estritamente da relação com polinizadores bióticos para obter sucesso na polinização e, em troca, oferecem recompensas florais durante o forrageamento do polinizador (Ollerton, 2017). No entanto, algumas flores são descritas como desprovidas de recompensas e atraem seus polinizadores por meio da sinalização desonesta de um recurso (Renner, 2006). Essa estratégia é chamada de polinização por engodo e apresenta um dos tipos de mimetismo mais convincentes de evolução adaptativa via seleção natural (Nilsson, 1992; Jersáková *et al.*, 2006). Flores polinizadas por engodo geralmente apresentam características florais comuns a flores produtoras de recurso, como néctar, onde sinais como odor, coloração e guias de néctar atraem polinizadores durante o forrageamento, porém não produzem de fato o recurso (Dafni, 1984; Ackerman, 1986).

Para a família Orchidaceae, baixas taxas de sucesso reprodutivo são comumente relacionadas ao sistema de polinização por engodo (Ferdy *et al.*, 1998; Tremblay *et al.*, 1998; Galizia *et al.*, 2005; Schiestl, 2005; Jerkášová *et al.*, 2006), considerando que o polinizador discerne quais plantas são desprovidas de recursos na comunidade e aprende a evitá-las. (Nilsson, 1992; Hansen & Olesen 1999; Johnson *et al.*, 2003, Tremblay *et al.*, 1998;). Esse sistema de polinização vem sendo descrito em diversos gêneros não relacionados e está presente em todas as subtribos (Dressler, 1981; Smidt *et al.*, 2006, Silva-Pereira *et al.*, 2007; Endara *et al.*, 2010; Policha *et al.*, 2019).

Recentemente, têm sido descobertas pequenas quantidades de recursos em espécies que antes eram consideradas completamente polinizadas por engodo. Esses recursos exercem função extremamente relevante na atratividade da flor (Reiter *et al.*, 2018, 2019; Phillips, 2020) e servem como “sinalizador de sabor” provocando maior tempo de forrageamento dos polinizadores e ocasionando maiores chances de polinização (Smithson & Gigord 2001; Shrestha *et al.*, 2020). No entanto, se de fato, pode aumentar

significativamente a visitação eficiente e o sucesso reprodutivo em populações naturais são questões que permanecem em aberto.

Nas flores de orquídeas, os grãos de pólen são derivados de um único estame, que se encontram reunidos em polínias, e estas são concentradas em uma unidade de dispersão, chamado de polinário (Barros & Kerbauy, 2004; Cozzolino & Widmer, 2005). Por conseguinte, o sucesso reprodutivo fica restrito a apenas dois níveis: (1) na remoção do polinário (uma estimativa do sucesso reprodutivo masculino) e (2) na formação de frutos (sucesso reprodutivo feminino). Para indivíduos que possuem apenas uma flor, o sucesso reprodutivo pode ser nulo caso haja alguma falha no processo de polinização (Sun *et al.*, 2017). Todavia, os efeitos das falhas reprodutivas são reduzidos em indivíduos compostos de inflorescências com muitas flores, tendo em vista que, mesmo que a polinização seja falha em algumas flores poderá ocorrer em outras da mesma inflorescência (Tremblay, 2006; Vandewoestijne *et al.*, 2009).

Dentro de Orchidaceae, a subtribo Pleurothallidinae (Orchidaceae) é composta de cerca de 5.100 espécies (Karremans, 2016) e possui o sistema de polinização por engodo como síndrome de polinização generalizada, sendo os insetos da ordem Diptera os principais agentes polinizadores (Pridgeon *et al.*, 2001; Karremans & Diaz-Moráles 2019). Em geral, as moscas percebem os estímulos químicos melhor do que outros insetos, sendo capazes não apenas de reconhecer e diferenciar odores e sabores, mas também a presença de água, sal, e açúcar por meio de células receptoras especializadas (Woodcock *et al.*, 2014). Embora Diptera já tenha sido considerado um vetor irregular e ineficiente (Christensen, 1994), estudos de campo mostraram que as interações entre moscas e flores de orquídea são complexas e podem ser especializadas.

Na subtribo, a secreção de néctar é descrita para algumas espécies e é positivamente relacionada ao sucesso reprodutivo feminino e masculino, assim como,

comumente ocorre dentro da Família Orchidaceae Karremans *et al.*, 2015). Dois exemplos são: *Pleurothallis marthae* Luer (Duque-Buitrago *et al.*, 2014), onde a oferta de néctar, associada à abundância floral e emissão de odores semelhantes a fungos garantiu a frutificação nas populações naturais. E algumas espécies de *Specklinia* Lindl., onde o sucesso reprodutivo masculino e a polinização ocorreram devido à secreção de néctar e agregação de feromônios atrativos para moscas do gênero *Drosophila* Fabricius (Karremans *et al.*, 2015).

Nos últimos anos, em Pleurothallidinae, sistemas sofisticados de polinização por engodo, que apresentam pequenas quantidades de recursos florais, vêm sendo descritos (Albores-Ortiz & Sosa, 2006; Bogarín *et al.*, 2018), como a secreção de proteínas e carboidratos em *Trichosalpinx* (Bogarín *et al.*, 2018). Esse sistema induz o polinizador a permanecer mais tempo forrageando a flor aumentando a chance do polinário ser removido e depositado de maneira eficiente (Shrestha *et al.*, 2020).

Em espécies miófilas, o recurso mimetizado é geralmente sinalizado por combinações de cores, ornamentos florais e emissão de voláteis complexos (Cardoso-Gustavson *et al.*, 2017; Bogarín *et al.*, 2018; Karremans & Dias-Morález 2019). As sapromiófilas combinam a cor roxa predominante e a emissão de voláteis complexos, que simulam a decomposição de matéria orgânica que atrai moscas cleptoparasitárias fêmeas em busca de locais de oviposição (da Silva *et al.* 1999; Cardoso-Gustavson *et al.* 2017; Arévalo-Rodrigues 2021).

No Bioma Mata Atlântica, local importante para o surgimento e diversificação da subtribo (Morales *et al.*, 2020), somam-se mais de 200 espécies de Pleurothallidinae. Gêneros como *Acianthera* Scheidw., *Anathallis* Barb.Rodr., *Octomeria* R.Br., *Pleurothallis* R.Br. e *Specklinia* Lindl., representam mais de 15% da riqueza das Orchidaceae no Bioma (Stehmann *et al.*, 2009). A diversificação rápida e recente é

provavelmente responsável pela grande variação na morfologia floral e tem sido fortemente relacionada a adaptações a polinizadores em interações altamente complexas (Pérez-Escobar *et al.*, 2017; Morales *et al.*, 2020; Karremans & Díaz-Morales 2019)

A complexidade ecológica e evolutiva do grupo resultou na elaboração dos seguintes questionamentos: (1) As estratégias reprodutivas das flores como presença de proteínas e amido, coloração do labelo (amarelo, amarelo-esverdeado e roxo) e a emissão de perfumes estão relacionadas positivamente ao sucesso reprodutivo das espécies? (2) A produção de flores, exibição floral (*display floral*), duração da floração e disposição das flores nas inflorescências (únicas e múltiplas) garantem maior sucesso reprodutivo para as espécies? (1) As estratégias florais envolvendo a presença de proteínas e/ou amido garantem uma forma sofisticada de polinização por engodo e pode assegurar maior sucesso reprodutivo para as espécies. (2) A quantidade de flores produzidas, exibidas e que apresentam longa duração pode garantir maior sucesso reprodutivo das espécies por simplesmente atrair mais visitantes e polinizadores.

## **Material e métodos**

### ***Área de estudo***

A pesquisa foi conduzida na Reserva Particular do Patrimônio Natural Nhandara Guaricana (RPPN Nhandara Guaricana), localizada no Primeiro Planalto Paranaense, dentro dos limites da Área de proteção Ambiental de Guaratuba. A RPPN é delimitada à Leste pela Área de Proteção Guaricana, remanescente de Floresta Nativa protegida pela Companhia Paranaense de Energia-(COPEL) (Sociedade Chauá, 2008). O clima regional segundo Köppen é caracterizado pelo tipo Cfb - Clima Subtropical Úmido Mesotérmico, caracterizado por verões frescos, estação de inverno com geadas severas e frequentes e estação seca ausente. A RPPN insere-se no domínio do Bioma da Mata Atlântica possuindo as maiores características da Floresta Ombrófila Densa (FOD) Montana Nas árvores é encontrada uma grande diversidade de plantas epífitas

principalmente das famílias Araceae, Bromeliaceae e Orchidaceae (Sociedade Chauá, 2009), incluindo espécies de Pleurothallidinae.

### ***Espécies estudadas***

Estudamos 448 indivíduos de orquídeas, dentro das 17 espécies da subtribo Pleurothallidinae selecionadas (Figura 1). Todas as espécies são epífitas e ocorrem comumente no Bioma Mata Atlântica.

Os indivíduos foram marcados com placas permanentes e georreferenciados com GPS Garmin. Para a marcação foram considerados aqueles que estavam até a 1,65 cm da altura do solo, ao longo de três trilhas existentes na reserva e também no interior da mata fechada. Os vouchers das espécies foram depositados no herbário da Universidade Federal do Paraná (UPCB). (Tabela S1).

Foram consideradas espécies com características miófilas as quais possuem coloração do labelo amarela ou amarela-esverdeada. Espécies com características sapromiófilas foram consideradas as espécies com labelo roxo. As espécies sapromiófilas são comumente sem néctar e têm grandes vacúolos ricos em antocianinas na epiderme do labelo que fornecem uma cor roxa intensa (Arévalo-Rodrigues *et al.*, 2021). Apenas a coloração do labelo foi considerada por ser a principal estrutura da flor responsável pela emissão dos perfumes, recursos e ter geralmente uma cor predominante (Arévalo-Rodrigues *et al.*, 2021).

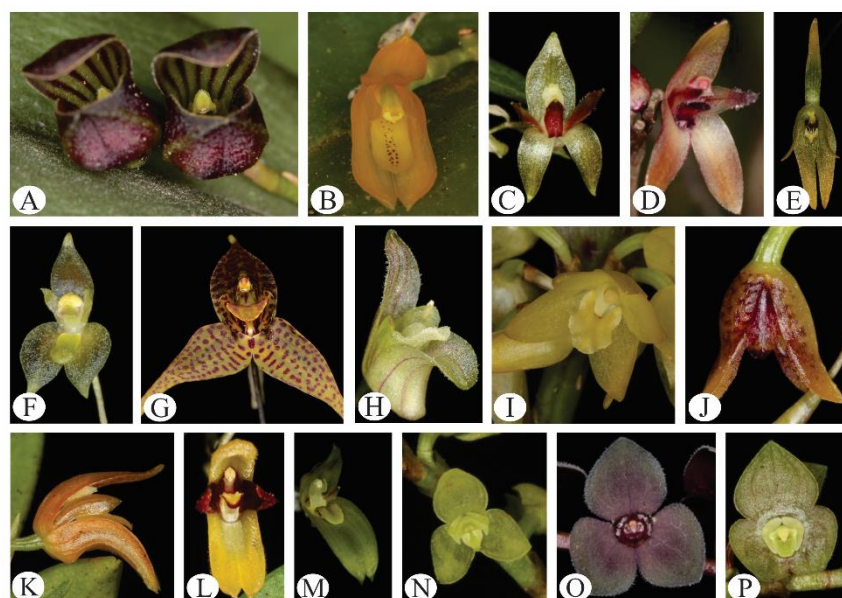


Figura 1. Espécies monitoradas na RPPN Nhandara Guaricana. A) *Acianthera glanduligera*; B) *A. luteola*; C) *Anathallis adenochila*; D) *A. microphyta*; E) *Barbosella gardnerii*; F) *B. miersii*; G) *Dryadella zebrina*; H) *Muscarella cryptophyta*; I) *Octomeria crassifolia*; J) *Pabstiella fusca*; K) *Pabstiella trifida*; L) *P. versicolor*; M) *Specklinia grobyi*; N) *Stelis aprica*; O) *S. argentata*; P) *S. papaquerensis*.

### ***Recursos, fenologia e sucesso reprodutivo***

As estratégias florais relacionadas a presença de osmóforos, proteínas e amido, antese, disposição floral (flores únicas ou múltiplas em inflorescências) e cor do labelo (amarelo-esverdeado, amarelo ou roxo) foram investigadas com o objetivo de averiguar quais características estavam envolvidas positivamente ao sucesso reprodutivo masculino e feminino das espécies.

Testes histoquímicos foram realizados em flores frescas inteiras para indicar se nos tecidos havia a presença de: osmóforos, através do teste do vermelho neutro (Vogel, 1990), proteínas, através do azul de coomasie (Cawood *et al.*, 1978) e amido, através do teste do lugol (Johansen, 1940). As flores foram submersas por 20 min e lavadas em água corrente para observação das áreas coradas. Flores recém-abertas foram dissecadas e visualizadas em estereomicroscópio para detectar secreções.

Para a maioria das espécies havia flores disponíveis na área de estudo e na Casa de Vegetação do Centro Politécnico da Universidade Federal do Paraná as quais foram coletadas em antese para as análises. Entretanto, para alguns táxons, a literatura foi consultada para compilar dados sobre a secreção de recursos em espécies que já haviam sido submetidas a testes histoquímicos anteriores (Tabela 1).

O acompanhamento fenológico para cada indivíduo foi feito de março de 2019 a fevereiro de 2020. Monitoramos a fenologia da floração de cada espécie com o intuito de observar a época da fenofase assim como a sua duração: curta (até três meses), intermediária (quatro a sete meses) ou longa (acima de oito meses). Consequentemente observamos o total de flores produzidas, a antese e disposição nas inflorescências. A



fenologia da frutificação foi anotada de maneira qualitativa e quantitativa e os dados foram utilizados para as análises de sucesso reprodutivo.

Para o sucesso reprodutivo masculino registramos o número de flores com polinário removido em relação ao número total de flores observadas em antese no momento do censo, em cada uma das plantas marcadas. Avaliamos o sucesso reprodutivo feminino no final do período reprodutivo de cada espécie, através da contagem do número de frutos formados em relação ao número total de flores produzidas. Quantificamos o total de flores produzidas dentro do período reprodutivo através da contagem direta do número de cicatrizes florais e frutos em cada inflorescência ou número de pedúnculos florais e frutos em plantas com flores únicas, assumindo que cada cicatriz foi uma flor não fecundada.

### *Análises*

A porcentagem de polinários removidos (PPR) em relação às flores abertas, e o número total de flores produzidas com porcentagem total de frutos (PTF), em relação ao total de flores produzidas entre as 17 espécies amostradas foram analisadas através do cálculo de regressão linear. As quantidades foram transformadas em log e as porcentagens foram transformadas em proporções. No entanto, estudos comparativos de múltiplas espécies podem ser comprometidos se as espécies descendem de um ancestral comum, resultando em características que não são independentes (Felsenstein 1985). Considerando o efeito de relações filogenéticas, realizamos um teste de Felsenstein (1985) de Contrastes Independentes filogenéticos (PIC) A árvore filogenética está disposta no material suplementar (fig. S1). Os PICs foram obtidos usando o pacote ape versão 5.0 (Paradis & Schliep, 2019) em ambiente de software R (<https://www.r-project.org/>). Outro round de regressões lineares foi feito usando os contrastes, e os

resultados foram comparados com as análises anteriores para detectar o viés filogenético dos dados.

Análises foram realizadas através do GLM (modelo linear generalizado). O objetivo foi verificar se o sucesso reprodutivo masculino e sucesso reprodutivo feminino foram influenciados por características florais. Por serem porcentagens, os GLMs foram configurados com distribuição binomial e função logit-link (Crawley 2007). As variáveis preditoras foram: presença de (1) proteína, (2) presença de amido, (3) duração da floração em meses, (4) tipo de *display floral* (flores únicas ou múltiplas) e (5) cor do labelo. As variáveis resposta foram o total de polinários removidos de flores em antese e de frutos formados em relação ao total de flores produzidas. As análises também foram realizadas excluindo *Stelis aprica* e *S. papaquerensis* pois tinham apenas um indivíduo marcado.

## Resultados

### *Recursos, fenologia e sucesso reprodutivo*

Os testes histoquímicos indicaram que todas as flores possuem osmóforos em pelo menos uma peça floral, onze espécies (64%) secretam proteínas e doze espécies (70%) indicaram a presença de amido (Tabela 1) (Figura S2). Não foi observada umidade nas peças florais, mesmo em *A. luteola* (Singer e Coccuci 1999) e *O. crassifolia* (Barbosa *et al.* 2009), descritas na literatura como secretoras de néctar. Quanto à coloração do labelo, oito espécies (47%) tem o labelo roxo, cinco (29%) tem o labelo amarelo e quatro (23%) tem o labelo amarelo-esverdeado (Tabela 1).

O período de floração da comunidade ocorreu durante todo o ano de monitoramento. Três espécies têm um curto período de floração de até três meses (*Anathallis microphyta*, *Octomeria crassifolia* e *Stelis aprica*), seis espécies tem duração intermediária da floração entre quatro e sete meses (*Acianthera glanduligera*, *A. luteola*,

*Barbosella gardnerii*, *Dryadella zebrina*, *Specklinia grobyi* e *Stelis papaquerensis*), as demais espécies tem duração longa da floração de mais de oito meses (Tabela 1).

Tabela 1. As 17 espécies monitoradas e seus atributos florais. Os recursos encontrados e os dados compilados da literatura para espécies secretoras de néctar, seguidos da coloração das peças florais, o *display floral*, disposição e a antese das flores nas inflorescências e a época de floração.

Espécies	Recurso	Cor do labelo	Display floral	Antese floral	Época de floração
<i>Acianthera glanduligera</i> (Lindl.) Luer	Ausente	Amarelo	Inflorescência solitária em racemo	Simultânea	Jul-Jan
<i>Acianthera luteola</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	Nectar <sup>1</sup> , proteínas, amido	Amarelo	Inflorescência solitária em racemo	Simultânea	Fev-Mai
<i>Anathallis adenochila</i> (Loefgr.) F.Barros	Amido	Roxo	Flores únicas	Sucessiva	Dez-Jul
<i>Anathallis microphyta</i> (Barb.Rodr.) C.O.Azevedo & van den Berg	Proteínas	Roxo	Flores únicas	Sucessiva	Dez-Jan
<i>Barbosella gardnerii</i> (Lindl.) Schltr.	Proteínas e amido <sup>2</sup>	Roxo	Flores únicas	Simultânea	Ago-Dez
<i>Barbosella miersii</i> (Lindl.) Schltr.	amido <sup>2</sup>	Amarelo-esverdeado	Flores únicas	Simultânea	Jan-Ago
<i>Dryadella zebrina</i> (Porsch) Luer	Proteínas e amido <sup>2</sup>	Roxo	Flores únicas	Sucessiva	Out-Jan
<i>Muscarella</i>	Proteínas	Amarelo-esverdado	Flores únicas	Sucessiva	Nov-Jul
<i>Octomeria crassifolia</i> Lindl.	Nectar <sup>3</sup> , amido <sup>4</sup>	Amarelo	Múltiplas flores em fascículo	Simultânea	Mai-Jun
<i>Pabstiella colorata</i> (Lindl.) Luer	Ausente	Roxo	Inflorescência solitária em racemo	Simultânea	Jan-Dez
<i>Pabstiella fusca</i> (Lindl.) Chiron & Xim.Bols.	Proteínas	Roxo	Inflorescência solitária em racemo	Simultânea	Jan-Dez
<i>Pabstiella trifida</i> (Lindl.) Luer	Proteínas e amido	Amarelo	Flores únicas	Sucessiva	Mar-Dez
<i>Pabstiella versicolor</i> (Porsch) Luer	Proteínas e amido	Roxo	Flores únicas	Sucessiva	Dez-Set
<i>Specklinia grobyi</i> (Bateman ex Lindl.) F.Barros	Amido	Amarelo	Flores múltiplas em racemo	Simultânea	Nov-Mai
<i>Stelis aprica</i> Lindl.	Proteínas e amido	Amarelo-esverdeado	Flores múltiplas em racemo	Sucessiva	Set-Out
<i>Stelis argentata</i> Lindl.	Proteínas e amido	Roxo	Flores múltiplas em racemo	Sucessiva	Jan-Dez
<i>Stelis papaquerensis</i> Rchb.f.	Proteínas e amido	Amarelo-esverdeado	Flores múltiplas (às vezes multiplas) em racemo	Sucessiva	Out-Fev

1 Singer e Cocucci (1999)

2 Forstner (2020)

3 Barbosa et al. (2009)

Das 448 plantas monitoradas, 399 floresceram durante o período de estudo. Um total de 336 flores abertas foi contado entre as espécies de flor única e 2.110 entre as flores múltiplas durante as observações mensais. Ao contabilizar as cicatrizes e pedúnculos, estimamos um total de 637 flores produzidas por espécies de uma única flor e 5.356 flores por espécies de flores múltiplas no final do período de floração.

A maior produção floral em espécies de flores únicas foi para *Barbosella miersii* 26,3 ( $\pm$  9,4) e frutificação em *B. gardnerii* 5 ( $\pm$  1). Nas espécies de flores múltiplas, a maior média de produção floral e frutificação foi em *Stelis argentata* em 61,4 ( $\pm$  49,6) e 8,8 ( $\pm$  16,6), respectivamente. *Stelis aprica* e *S. papaquerensis* tiveram apenas um indivíduo monitorado. O total de produção de flores para essas espécies foi de 184 e 375, respectivamente e de frutos foi de 22 e 92, respectivamente. As espécies *Anathallis microphyta* (flor única) e *Acianthera luteola* (flores múltiplas) não frutificaram durante o período de monitoramento. A porcentagem de polinários removidos variou em zero em *Anathallis microphyta* a 41,89% em *Pabstiella trifida* entre as espécies de flor única, e entre 10,87% em *Acianthera glanduligera* e 74,07% em *A. luteola* entre espécies com flores múltiplas (Tabela 2).

De maneira geral, espécies com características miófilas tiveram sucesso reprodutivo masculino acima de 40% superior a espécies quando comparadas a espécies com características sapromiófilas que tiveram sucesso reprodutivo masculino inferior a 40%. Enquanto espécies com as características sapromiófilas tiveram sucesso feminino acima de 10% quando comparadas a espécies com características miófilas que tiveram o sucesso reprodutivo feminino igual ou abaixo de 10% (Tabela 2).

Tabela 2. Padrão de floração e parâmetros de sucesso reprodutivo masculino e feminino de 17 espécies de micro-orquídeas de Pleurothallidinae. *N* = número de indivíduos monitorados; *N* inflorescência = número total de inflorescências produzidas por espécies; *N* flores em antese = número de flores observadas na antese; MFA = número médio de flores observadas na antese ( $\pm$  DP); *N* pol. remov. = Número de polinários removidos; PPR = porcentagem de polinário removido; *N* prod. de flores = número de cicatrizes / pedúnculos + número de frutos contados ao final da floração; MPF = número médio de produção de flores ( $\pm$  DP); *N* frutos = número de frutos contados ao final do período de floração; MF = número médio de frutificação; PTF = porcentagem total de frutos.

Espécies	<i>N</i>	<i>N</i> inflor.	<i>N</i> flores antese	MFA	<i>N</i> pol. remov.	PPR	<i>N</i> prod. de flores	MPF	<i>N</i> frutos	MF	PTF
<b>Flores únicas</b>											
<i>Anathallis adenochila</i>	10	-	39	3.9 ( $\pm$ 2.2)	15	38,4	86	8.6 ( $\pm$ 3.7)	13	1.3 ( $\pm$ 2.0)	15,12
<i>A. microphyta</i>	3	-	4	1.3 ( $\pm$ 0.6)	0	0	8	2.7 ( $\pm$ 0.6)	0	0	0
<i>Barbosella gardneri</i>	3	-	71	23.7 ( $\pm$ 13.0)	22	30,9	79	26.3 ( $\pm$ 9.4)	15	5.0 ( $\pm$ 1.0)	18,99
<i>B. miersii</i>	39	-	55	1.4 ( $\pm$ 1.2)	22	40	270	6.9 ( $\pm$ 4.6)	36	0.9 ( $\pm$ 1.3)	13,33
<i>Dryadella zebrina</i>	18	-	32	1.8 ( $\pm$ 1.1)	5	15,6	36	2 ( $\pm$ 1.2)	4	0.2 ( $\pm$ 0.5)	11,11
<i>Muscarella cryptophyta</i>	3	-	16	5.3 ( $\pm$ 0.6)	5	31,2	19	6.3 ( $\pm$ 1.1)	2	0.7 ( $\pm$ 0.6)	10,53
<i>Pabstiella trifida</i>	14	-	74	5.3 ( $\pm$ 3.1)	31	41,8	81	5.8 ( $\pm$ 3.3)	7	0.5 ( $\pm$ 0.9)	8,64
<i>P. versicolor</i>	10	-	45	4.5 ( $\pm$ 2.1)	18	40	58	5.8 ( $\pm$ 2.4)	11	1.1 ( $\pm$ 1.6)	18,97
<b>Flores Múltiplas</b>											
<i>Acianthera glanduligera</i>	3	20	46	15.3 ( $\pm$ 3.5)	5	10,8	57	19 ( $\pm$ 3)	1	0.3 ( $\pm$ 0.6)	1,75
<i>A. luteola</i>	2	40	27	13.5 ( $\pm$ 4.5)	20	74,0	33	16.5 ( $\pm$ 7.8)	0	0	0
<i>Octomeria crassifolia</i>	2	13	40	20 ( $\pm$ 7.1)	16	40	68	34 ( $\pm$ 7.1)	1	0.5 ( $\pm$ 0.7)	1,47
<i>Pabstiella colorata</i>	127	486	501	3.9 ( $\pm$ 3.1)	236	47,1	800	6.3 ( $\pm$ 5.9)	120	1.0 ( $\pm$ 2.0)	15
<i>P. fusca</i>	106	440	480	4.5 ( $\pm$ 3.2)	258	53,7	1.233	11.6 ( $\pm$ 8.2)	134	1.2 ( $\pm$ 2.0)	10,87
<i>Specklinia grobyi</i>	14	29	55	3.9 ( $\pm$ 2.8)	21	38,1	118	8.4 ( $\pm$ 6.2)	6	0.4 ( $\pm$ 1.6)	5,08
<i>Stelis aprica</i>	1	16	32	32	19	59,3	184	184	22	22	11,95
<i>S. argentata</i>	43	222	830	19.3 ( $\pm$ 12.8)	452	54,4	2.640	61.4 ( $\pm$ 49.6)	379	8.8 ( $\pm$ 16.4)	14,36
<i>S. papaquerensis</i>	1	16	99	99	56	56,5	375	375	92	92	24,53

### Análises

A PPR é positivamente afetada pelo número de flores (Figura 2) em ambas as regressões lineares usando dados brutos ( $R^2 = 0,25$ ,  $P = 0,040$ ) e contrastes filogenéticos

( $R^2 = 0,35$ ,  $P = 0,013$ ). A relação entre o total de flores produzidas e PTF também é positiva, mas não significativa considerando os dados brutos ( $R^2 = 0,23$ ,  $P = 0,051$ ) e os contrastes filogenéticos ( $R^2 = 0,07$ ,  $P = 0,300$ ). A consistência nos resultados com e sem PICs mostra que nossos dados não são afetados por relações filogenéticas.

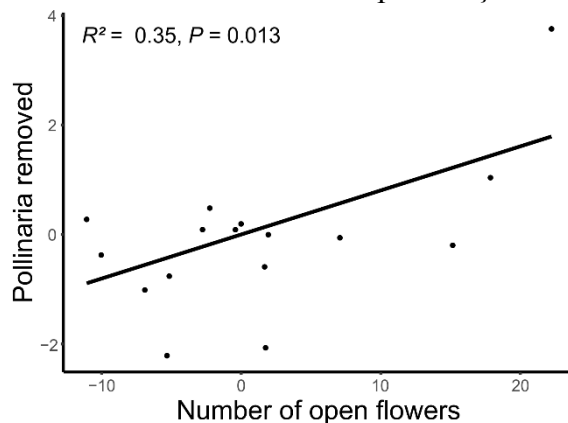


Figura 2. Relação positiva entre o número a quantidade de flores em antese e a porcentagem de remoção de polinários.

De acordo com nossos resultados de GLM, espécies que armazenam proteínas apresentaram maior PPR ( $z = 4,113$ ,  $P < 0,001$ , Figura 3, Tabela 3), mas nenhum efeito sobre a PTF ( $z = 0,555$ ,  $P = 0,579$ ). A presença de amido não teve efeito sobre a PPR ( $z = -0,977$ ,  $P = 0,329$ ) e um efeito positivo na PTF ( $z = 2,317$ ,  $P = 0,021$ , Figura 4, Tabela 3). Em relação às características florais, a cor do labelo afeta tanto PPR ( $z = -2,076$ ,  $P = 0,038$ , Figura 3, Tabela 4) como PTF ( $z = -3,110$ ,  $P = 0,002$ , Figura 4, Tabela 4), com flores com labelo amarelo-esverdeado tendo maior sucesso reprodutivo masculino e feminino. Espécies com longos períodos de floração também apresentaram maior PPR ( $z = 3,335$ ,  $P = 0,001$ , Figura 3, Tabela 4) e PTF ( $z = 2,352$ ,  $P = 0,019$ , Figura 4, Tabela 4). Assim como, espécies com *display* de flores múltiplas também tiveram maior PPR ( $z = 5,450$ ,  $P < 0,01$ , Figura 3, Tabela 4). O *display floral* não influenciou no PTF em relação às outras espécies ( $z = 1,484$ ,  $P = 0,138$ ). Ao desconsiderar *Stelis aprica* e *S. papaquerensis* das análises de GLM, a PPR é positivamente afetada pela presença de proteínas ( $z = 3,986$ ,  $P < 0,001$ , Figura S, Tabela S3), *display floral* de flores múltiplas ( $z = 3,967$ ,  $P < 0,001$ , Figura S3, Tabela S3) e fenologia de longa duração ( $z = 3,991$ ,  $P < 0,001$ , Figura S3, Tabela S3). A PTF é positivamente afetada pelo *display floral* de flor única ( $z = -3,050$ ,  $P = 0,002$ , Figura S4, Tabela S4), flores com labelo roxo ( $z = 2,956$ ,

$P = 0,003$ , Figura S4, Tabela S4) e fenologia de longa duração ( $z = 3,744$ ,  $P < 0,001$ , Figura S4, Tabela S4).

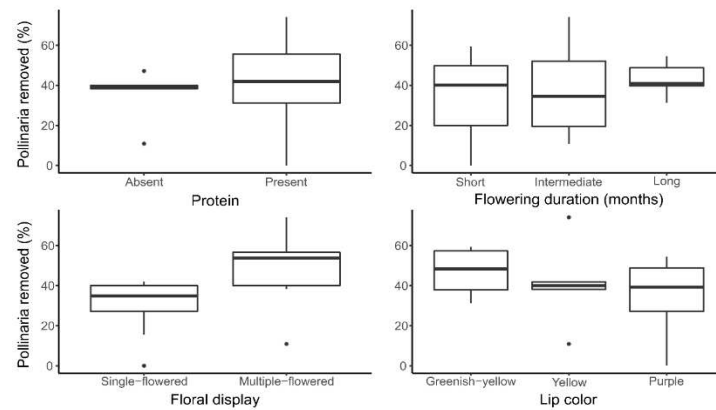


Figura 3. Efeito positivo das proteínas, duração de floração, *display floral* de flores múltiplas e coloração do labelo sobre o sucesso reprodutivo masculino. O labelo de coloração amarelo esverdeado teve maior influência sobre o sucesso reprodutivo masculino.

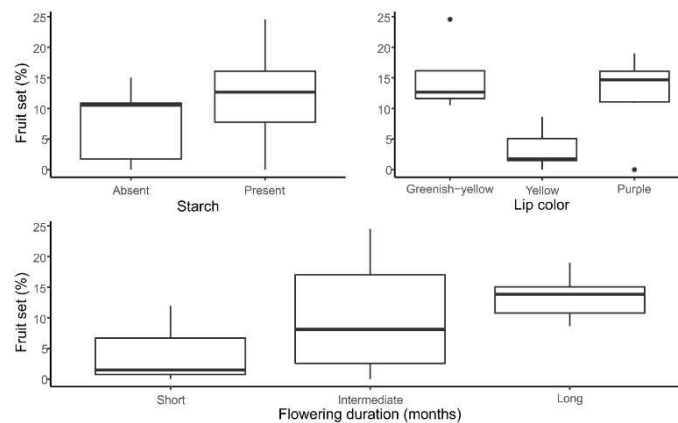


Figura 4. Efeito positivo de amido, duração de floração coloração do labelo e duração da floração sobre o sucesso reprodutivo feminino. O labelo de coloração amarelo esverdeado teve maior influência sobre o sucesso reprodutivo feminino.

Tabela 3. Efeito da presença de proteínas e amido na porcentagem de PPR e PTF nas 17 espécies de orquídeas, analisadas através do GLM.

PPR					PTF			
Preditores	Estimate	Std. Error	z value	P value	Estimate	Std. Error	z value	P value
Proteína	0,403	0,098	4,113	<b>&lt; 0.001</b>	0,053	0,095	0,555	0,579
Amido	-0,088	0,090	-0,977	0,329	0,195	0,084	2,317	<b>0,021</b>

Tabela 4. Efeito do *display floral*, duração da floração (meses) e cor do labelo na porcentagem de PPR e PTF nas 17 espécies de orquídeas, analisadas através do GLM.

Preditores	Estimate	Std. Error	z value	P value	Estimate	Std. Error	z value	P value
<i>Display floral</i>	0,704	0,129	5,450	<b>&lt; 0.01</b>	0,219	0,148	1,484	0,138
Duração da floração	0,376	0,113	3,335	<b>0,001</b>	0,269	0,115	2,352	<b>0,019</b>
Cor do labelo	-0,186	0,090	-2,076	<b>0,038</b>	-0,253	0,081	-3,110	<b>0,002</b>

## Discussão

Um padrão que emerge de nossos resultados é que a combinação de características atrativas florais parece favorecer diferentemente o sucesso reprodutivo masculino em espécies com características miófilas e o sucesso reprodutivo feminino em espécies com características sapromiófilas. Espécies com características miófilas como labelo amarelo e amarelo-esverdeado, que produziram mais flores, floração longa, flores dispostas em inflorescências e armazenam proteínas apresentaram maior sucesso reprodutivo masculino que as espécies com menos flores e sem proteínas. Nossos resultados sugerem que o armazenamento dessa substância é importante para atratividade e permanência do polinizador na flor, influenciando o sucesso reprodutivo masculino. Enquanto espécies com características sapromiófilas como labelo roxo, fenologia da floração longa e presença de amido apresentaram maior sucesso reprodutivo feminino que espécies com labelo amarelo ou amarelo-esverdeado. A presença de amido parece induzir uma segunda visita do polinizador e garantir a frutificação.

### *Recursos, fenologia e sucesso reprodutivo*

Através do levantamento bibliográfico feito para as espécies, *Acianthera luteola* (Singer e Coccuci, 1999) e *Octomeria crassifolia* (Barbosa *et al.*, 2009), secretam néctar como recompensa floral. Descrições detalhadas das estruturas secretoras em flores de Pleurothallidinae indicam que espécies miófilas típicas têm nectários no labelo e osmóforos nas sépalas laterais e dorsais (Arévalo-Rodrigues 2021), conforme relatado em *Acianthera* (Borba & Semir 2001; Melo *et al.* 2010), *Octomeria* (Barbosa *et al.*, 2009), e também em *Bulbophyllum* (Borba & Semir 1998; Nunes *et al.*, 2014). Em nossos estudos, espécies com nectários no labelo, como *Acianthera luteola* (Singer & Cocucci 1999) e *Octomeria crassifolia* (Barbosa *et al.*, 2009) tiveram alto sucesso reprodutivo masculino, com 74% e 40% de remoção de polinário, respectivamente. Além disso, a presença de néctar pode atuar como um potencial atrativo floral para moscas (Melo *et al.*,



2010), mas não garante maior sucesso reprodutivo feminino. Resultados semelhantes foram relatados para *Acianthera teres* (Lindl.) Borba e *A. ochreatea* (Lindl.) Pridgeon & MW Chase, nos quais os nectários podem desempenhar um papel importante na atração de moscas Phoridae, mas não promovem significativamente o sucesso reprodutivo em populações naturais (Borba & Semir 2001).

Grande parte das nossas espécies (64%) indicou a presença de proteínas. Em Pleurothallidinae, Bogarín *et al.* (2018) encontraram no gênero *Trichosalpinx* a secreção desse recurso. Assim como nas espécies monitoradas, esse gênero também foi influenciado positivamente pelo sucesso reprodutivo masculino. Em campo, foram observadas moscas forrageando as flores de *S. papaquerensis*. Os animais ficaram minutos consecutivos nas flores. Argumenta-se que as características florais como, coloração do labelo (geralmente roxo), movimentação do labelo ciliado e a ornamentação ciliada das sépalas em algumas espécies, juntamente com a secreção de proteínas induz as moscas a permanecerem mais tempo sugando a pequena quantidade de recompensa secretada e aumentando a probabilidade de coleta e deposição do polinário (Borba e Semir 1998; Davies & Stpiczynska 2014; Bogarín *et al.*, 2018; Shrestha *et al.*, 2020).

Nossos resultados nos levam a crer que as proteínas sejam um sinal que promove maior tempo de forrageamento do polinizador na flor aumentando a chance de sucesso reprodutivo, principalmente o masculino e que seja um mecanismo que evoluiu independentemente em diferentes clados de Pleurothallidinae (Smithson & Gigord 2001; Dormont *et al.*, 2010; Shrestha *et al.*, 2020).

As espécies monitoradas com labelo roxo, reconhecidas como sapromiofilas, tiveram menor sucesso reprodutivo masculino, mas maior sucesso reprodutivo feminino do que espécies com características miófilas gerais, com frutificação superior a 10%. Exceto por *Anathallis microphyta*, *Pabstiella colorata* e *P. fusca*, todas as espécies aqui

consideradas sapromiófilas também secretam amido ou amido e proteínas na superfície labelar. Apesar de não ser oferecido em abundância como recurso, o amido pode atuar como sinalizador de sabor e aumentar a probabilidade de uma segunda visita do polinizador, principalmente se combinado também com a presença de proteínas (Shrestha *et al.*, 2020). *Barbosella gardneri* e *Pabstiella versicolor* tiveram cerca de 18% de frutificação, o que é mais do que o esperado para orquídeas polinizadas por engodo (Tremblay *et al.*, 2005). *Acianthera johannensis* (Barb. Rodr.) Pridgeon & M.W. Chase é uma espécie sapromiófila sem néctar que atrai moscas Chloropidae com certa especificidade (Borba & Semir 2001). Embora os autores concluíssem que é uma espécie polinizada por engodo, a frutificação em uma população específica é de 13,4%, semelhante às espécies sapromiófilas que avaliamos.

Nossos resultados apoiam as previsões que uma maior produção floral aumenta a probabilidade de visitas às flores e, portanto, espécies com uma única flor podem ter desvantagens em atrair visitantes quando comparadas às de flores múltiplas. O sucesso reprodutivo masculino é mais beneficiado pela quantidade de flores que o sucesso reprodutivo feminino, considerando que para a função feminina a energia pode ser concentrada na produção de frutos e sementes de qualidade (Vaughton & Ramsey 1998; Ehlers *et al.*, 2002; Cozzolino & Widmer, 2005; Li *et al.*, 2011). Além do fato, de que em orquídeas polinizadas por engodo, para que o sucesso reprodutivo feminino seja efetivado é necessário que o polinizador seja enganado duas vezes (Proctor & Harder 1995; Sun *et al.*, 2017) e por esses motivos acreditamos que apenas a função masculina tenha sido beneficiada pela quantidade de flores.

Das espécies monitoradas *Anathallis microphyta* (Borba *et al.*, 2011) e *Octomeria crassifolia* (Barbosa *et al.*, 2009) são espécies raras e auto-incompatíveis que tiveram poucos indivíduos monitorados cuja frutificação foi muito baixa: 0% e 1,75

respectivamente. O mesmo ocorreu no gênero *Acianthera* (Borba *et al.*, 2001) com *Acianthera luteola* e *A. glanduligera*: a primeira não se reproduziu e a última teve apenas 1,75% de frutificação, com dois e três indivíduos avaliados cada. Embora a auto-incompatibilidade não tenha sido testada, nossos resultados assumem que é uma condição natural para Pleurothallidinae e pode ter levado a limitação da reprodução para as espécies monitoradas. A limitação da polinização leva a uma baixa frutificação em populações naturais de orquídeas não autógamas (Tremblay *et al.*, 2005). Espécies polinizadas por engodo, com inflorescências minúsculas, características miófilas, hábitos epifíticos e pequenas populações tendem a ter frutificação ainda mais baixa (Christensen, 1992; Tremblay, 2006).

No nosso trabalho em *S. papaquerensis* cerca de 20 indivíduos foram vistos e posteriormente identificados como da família Cecydomiidae (Figura S5, Tabela S5). As moscas visitaram as flores, mas não polinizaram nenhuma. Uma mosca dessa família já foi registrada em *S. parvula* Lindl e estava carregando o polinário de uma das flores (Bogarín *et al.* 2016). Em *S. aprica* foi avistada uma mosca fêmea da família Empididae descansando sobre as inflorescências (Material Suplementar, Figura S6, Tabela S5). A família Empididae ainda não foi descrita como polinizadora de nenhuma espécie de *Stelis* e sequer como visitante floral (Karremans & Díaz-Morales 2019). *Stelis argentata* é uma espécie desprovida de néctar (Christensen, 1992), mas que através dos nossos testes indicaram a presença proteínas. Uma mosca não identificada foi observada forrageando suas flores, porém não foi avistada polinização efetiva (Material Suplementar, Figura S7, Tabela S5). Christensen (1992), observou moscas da família Drosophilidae nas flores da espécie, mas também não observou efetivamente a polinização.

De maneira geral, as espécies aqui pesquisadas possuem características típicas de espécies polinizadas por moscas e, o sistema de polinização por engodo sofisticado que envolve armazenamento de proteínas e/ou amido, emissão de perfumes e coloração das flores. Nosso trabalho contrapõe outros estudos da literatura que descrevem a secreção de néctar como o principal atrativo para o alcance do sucesso reprodutivo masculino e feminino (Scopece *et al.*, 2009). A polinização por engodo, particularmente a extremamente fraudulenta, se mostra sofisticada e eficaz para atração e enganação de polinizadores e indica ser um mecanismo que evoluiu independentemente em diferentes clados de Pleurothallidinae.

O custo de reprodução é um importante fator limitante na história de vida das espécies, e a interação ecológica entre planta e polinizador não parece favorecer a alta frutificação em orquídeas (Tremblay *et al.*, 2005). Assim, uma estratégia evolutiva eficiente é maximizar o número de frutos cruzados, dado um número limitado de frutos colhidos, que produzirão sementes de melhor qualidade, aos milhares, garantindo assim o equilíbrio no sucesso reprodutivo feminino (Cozzolino & Widmer 2005). O alto investimento em atrações florais em Pleurothallidinae, como emissão de perfumes, secreção de proteínas e amido e atrações de floração como maior produção de flores e maior exposição floral, aumentam a taxa de visitação e as chances de remoção de polinários e, conseqüentemente maior diversidade gamética, favorecendo a função masculina. Embora os padrões de floração possam favorecer a função reprodutiva masculina em espécies miófilas, a autoincompatibilidade pode ser um fator que reforça ainda mais a hipótese de que para o sucesso reprodutivo feminino, a frutificação mais baixa é compensada pela garantia de maior variabilidade genética gerada por um fruto. Por outro lado, em espécies sapromiófilas, as características de atração floral podem

desempenhar um papel para garantir maior frutificação em populações naturais, aumentando o sucesso feminino em comparação com as miófilas em geral.

São necessários estudos adicionais em Pleurothallidinae, em especial com as espécies da comunidade monitorada, para a descrição dos visitantes florais e polinizadores. Uma vez conhecidos, os sistemas de polinização poderão ser relacionados aos atributos descritos neste trabalho e serem melhor compreendidos. Também são recomendados estudos focados nos voláteis florais e na quantificação dos recursos, especialmente das proteínas e amido, que foram identificadas em grande parte das espécies.

## Referências

- Ackerman J.D. (1986). Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. *Lindleyana*, **1**, 108-113.
- Arévalo-Rodrigues G., Barros F., Davis A. R.; Cardoso-Gustavson, P. (2021) Floral glands in myophyllus and sapromyophyllus species of the Pleurothallidinae (Epidendroidae, Orchidaceae) – osmophores, nectaries, and a unique sticky gland. *Protoplasma*. DOI: 10.1007/s00709-021-01624-2.
- Albores-Ortiz O, Sosa Y. (2006). Polinización de los especies simpátricas de *Stelis* (Pleurothallidinae, Orchidaceae). *Acta Botânica do México*. (74).
- Barbosa A, Melo M.C., Borba E. (2009). Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematics and Evolution*. **283**, 1,1-8.
- Barbosa A, Melo M.C., Borba E. (2009). Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. *Plant Systematics and Evolution*. **283**, 1,1-8.
- Barros F., Kerbaux G.B. (2004). Orquidologia Sul Americana: uma compilação científica. São Paulo- SP: Secretaria do Meio Ambiente. Instituto de Botânica.
- Bogarín D., Pupulin F., Smets E., Gravendeel B. (2016). Evolutionary diversification and historical biogeography of the Orchidaceae in Central America with emphasis on Costa Rica and Panama. *Proceedings of the V Scientific Conference on Andean*

- Orchids, Cali, Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. *Lankesteriana* **16**, 189–200.
- Bogarín D., Fernández M., Borkent A., Heems K.A., Pupulin F., Ramírez S., Smets E., Gravendeel B., (2018). Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). *Botanical Journal of Linnean Society*. **186**, 4, 510–543.
- Borba E.L., Semir J. (1998) Wind-assisted fly pollination in three *Bulbophyllum* (Orchidaceae) species occurring in the Brazilian ‘campos rupestres’. *Lindleyana*. **13**, 203-218.
- Borba, E.L., Semir, J. (2001). Pollinator specificity and convergence in fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) species: a multiple population approach. *Annals of Botany*, **88**, 75-88.
- Borba, E.L., Barbosa, A., Melo, C.M., Gontijo, S. M. (2011). Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): evolutionary and systematic implications. *Lankesteriana*. **11**, 207-221.
- Cardoso-Gustavson, P., Souza, S. R., Barros, F. (2017). Floral volatile profile in Pleurothallidinae, an orchid subtribe pollinated by flies: ecological and phylogenetic considerations. *Phytochemistry Letters*. **22**, 49-55.
- Cawood, A.H., Potter, U. Dickinson, H.G (1978). An evaluation of Coomassie Brilliant Blue as a stain for quantitative microdensitometry of protein in section. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. **26**, 245.
- Cozzolino, S., Widmer, A. (2005). Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception? *Trends in Ecology & Evolution*. **20**, 487-94.
- Christensen, D. E. (1992) Notes on the reproductive biology of *Stelis argentata* Lindl. (Orchidaceae: Pleurothallidinae) in eastern Ecuador. *Lindleyana* **7**, 28-33.
- Christensen, D. E. (1994) Fly pollination in the Orchidaceae. In *Orchid Biology: Reviews and Perspectives VI* (Arditti J, ed.) John Wiley & Sons, New York, pp.415-454.
- da Silva U.F., L. Borba E., Semir J., Marsaioli A.J. (1999) A simple solid injection device for the analyses of *Bulbophyllum* (Orchidaceae) volatiles. *Phytochemistry*, **50**, 31–34.
- Dafni, A. (1984). Mimicry and Deception in Pollination. *Annual Review of Ecological, Evolution, and Systematics*. **15**, 259-278.

- Davies K.L., Stpiczynska M. (2014). Labellar anatomy and secretion in *Bulbophyllum Thouars* (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sect. *Racemosae* Benth. & Hook. f.; *Annals of Botany* **114**, 889-911.
- Dormont L., Delle-Vedove R., Schatz B.J.M, Bessière J-M., Key M.H. (2010). Rare white-flowered morphs increase the reproductive success of common purple morphs in a food-deceptive orchid. *New Phytologist*. **185**, 300-310.
- Dressler R.L. (1981) The orchids: natural history and classification. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA, pp. 1–334.
- Duque-Buitrago C.A., Alzate NF., Otero J.T. (2014). Nocturnal pollination by Fungus gnats of the colombian endemic species, *Pleurothallis marthae* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Lankesteriana* **13**, 3.
- Ehlers, B.K., Olesen, J. M.; Agren, J. 2002. Floral morphology and reproductive success in the orchid *Epipactis helleborine*: regional and local across-habitat variation. *Plant Systematics and Evolution*, **236**, 19-32.
- Endara L., Grimaldi D., Roy B. (2010). Lord of the flies: pollination of *Dracula* orchids. *Lankesteriana*, **10**, 1.
- Felsenstein, J. (1985) Phylogenies and the comparative method. *The American Naturalist*, **125**, 1–15.
- Ferdy J.B., Goyon P.H., Moret J., Godelle B. (1998). Pollinator Behavior and Deceptive Pollination: Learning Process and Floral Evolution. *The American Naturalist* **152**, 696-705.
- Galizia C.G., Kunze J., Gumbert A, Borg-Karlson AK, Sachse S, Markl C, Menzel R. 2005. Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system. *Behavioral. Ecology*. **16**, 159–168.
- Hansen I, Olense M. (1999). Comparison of reproductive success in two orchids: the nectarless *Dactylorhiza majalis* s.s. and the nectar-producing *Gymnadenia conopsea* s.l. *Nordical Journal of Botany*. **19**, 665-671.
- Jersáková, J., Johnson, S. D., Kindlmann, P. (2006) Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **81**, 219–235.
- Johansen, D.A. (1940) Plant microtechnique. New York: McGraw Hill Book, pp.1–523.
- Johnson, S.D. (1994) Evidence for Batesian mimicry in a butterfly-pollinated orchid. *Biological Journal of the Linnean Society* **53**, 91-104.

- Johnson S.D, Peter C.I, Agren J. (2003). The effects of nectar addition on pollen removal and geitonogamy in the non-rewarding orchid *Anacamptis morio*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **271**,803-809.
- Karremans A.P., Pupulin F., Grimaldi D., Beentjes, K.K., Butôt R., Fazzi G.E., Kaspers K., Kruizinga J., Roessingh P., Smets F., Gravendeel B. (2015). Pollination of *Specklinia* by nectar-feeding *Drosophila*: the first reported case of a deceptive syndrome employing aggre. Cartago- Costa Rica: *Annals of Botany*.**116**,437-55.
- Karremans A.P. (2016). Genera *Pleurothallidinarum*: an updated phylogenetic overview of pleurothallidinae. *Lankesteriana*. **16**, 219-241.
- Karremans A.P., Diaz-Morales M. (2019) *The Pleurothallidinae: extremely high speciation driven by pollinator adaptation*. Conference Papers: Systematics, pp. 363–388. Kindlmann P., Jersáková J., (2006). Effect of floral display on reproductive success in terrestrial orchids. *Folia Geobotanica*. **41**, 47-60.
- Li, P., Huang, B.Q., Pemberton, R.W., Luo, Y.B., Floral display influences male and female reproductive success of the deceptive orchid *Phaius delavayi*. *Plant Systematics and Evolution*. **296**, 21-27.
- Melo, M.C., Borba, E., Paiva, E.A (2010). Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Plant Systematics and Evolution* **286**, 141-151.
- Morales N.G., Toscano de Brito, A.L.V., Mauad A.V.S.R., Smidt E.C. (2020) Molecular phylogeny and biogeography of *Pabstiella* (Pleurothallidinae: Orchidaceae) highlight the importance of the Atlantic Rainforest for speciation in the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society*. boaa092.
- Nilsson L.A. (1992). Orchid pollination biology. *Trends in Ecology & Evolution*. **7**, 255-259.
- Nunes E.L.P., Smidt E.C., Stützel T., Coan AI. (2014) What do floral anatomy and micromorphology tell us about Neotropical *Bulbophyllum* section *Didactyle* (Orchidaceae: Bulbophyllinae)? *Botanical Journal of the Linnean Society*, 175, 438–452.
- Ollerton, J. (2017) Pollinator Diversity: Distribution, Ecological Function, and Conservation. *Annual Review of Ecological, Evolution, and Systematics*. **48**, 353-376
- Paradis E, Schliep K. (2019). ape 5.0: an environment for modern phylogenetics and evolutionary analyses in R. *Bioinformatics*. **35**, 526-528.



- Pérez-Escobar O.A., Chomicki G., Condamine F.L., Karremans A.P., Bogarín D., Matzke N.J., Silvestro D., Antonelli A. (2017) Recent origin and rapid speciation of Neotropical orchids the world's richest plant biodiversity hotspot. *New Phytologist*, **215**, 891–905.
- Phillips R.D., Bohman B., Brown G.R., Tomlinson S., Peakall R.A. (2020). A specialised pollination system using nectar-seeking thynnine wasps in *Caladenia nobilis* (Orchidaceae). *Plant Biology* **22**157–166.
- Policha T, Grimaldi, D.A. (2019). Dracula orchids exploit guilds of fungus visiting flies: new perspectives on a mushroom mimic. *Ecological Entomology*. **44**,454-470.
- Pridgeon, AM, Solano, R, Chase, MW. (2001). PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE): COMBINED EVIDENCE FROM NUCLEAR AND PLASTID DNA SEQUENCES1. Cidade do México. *American Journal of Botany* **88**, 2286-2308.
- Proctor H.C., Harder, L.D. (1995). Effect of pollination success on floral longevity in the orchid *Calypso bulbosa* (Orchidaceae). *American Journal of Botany* **82**, 1131–1136.
- R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Reiter N., Bohman B., Flematti G.R., Phillips R.D (2018). Pollination by nectar-foraging thynnine wasps: evidence of a new specialized pollination system for Australian orchids. *Botanical Journal Linnean of the Society*. **188**327–337.
- Reiter N., Bohman B., Flematti G.R., Phillips R.D (2019). Pollination of an endangered *Caladenia* species (Orchidaceae) by nectar-foraging behaviour of a widespread species of colletid bee. *Botanical Journal Linnean of the Society* **189**, 83–98.
- Renner S.S. (2006). Rewardless flowers in Angiosperms and the role of insect cognition in their Evolution. In: Waser NM, Ollerton J (eds) *Plant–pollinator interactions. From specialization to generalization*. University of Chicago Press, Chicago. 123-144 pp.
- Santos T.F., Amano E., Forstner A.C.S., Toscano de Brito A.L.V., Smidt, E.C. (2020) Floral Studies in *Octomeria* R. BR. (Orchidaceae: Pleurothallidinae). *Feddes Repertorium*, 131, 101–110.
- Schiestl FP. (2005). On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. *The Science of Nature*. **92**, 255-264.

- Scopece G, Schiestl F. Cozzolino S, Johnson, SD, Schiestl FP. 2009. Pollination Efficiency and the Evolution of Specialized Deceptive Pollination Systems. *Am. Nat.* 175(1):98-105.
- Scopece G., Gravendeel B., Cozzolino S. (2017). The effect of different chiral morphs on visitation rates and fruit set in the orchid *Spiranthes spiralis*. *Plant Ecology and Diversity*. **10**, 97-104.
- Shrestha M., Dyer A.G., Dorin A., Ren Z. X., Burd M. (2020). Rewardlessness in orchids: how frequent and how rewardless? *Plant Biology*. **22**, 555-561.
- Silva-Pereira V., Smidt E.C., Borba E.L. (2007). Isolation mechanisms between two sympatric *Sophranitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. *Plant Systematics and Evolution* **269**, 171-182.
- Singer R.B., Coccuci, A.A. (1999). Pollination mechanism in four sympatric southern Brazilian Epidendroidae orchids. *Revista Lindleyana*. **14**, 47-56
- Smidt E.C, Silva-Pereira V., Borba E.L. (2006). Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to North-eastern Brazil. *Plant Species Biology*. **21**, 85-91.
- Smithson A., Gigord L.D.B. (2001). Are there fitness advantages in being a rewardless orchid? Reward supplementation experiments with *Barlia robertiana*. *Proceedings of the royal society biological sciences*. **268**, 1435-1441.
- Sociedade Chauá. Plano de Manejo da Reserva Nhandara Guaricana São José dos Pinhais. Curitiba: Sociedade Chauá/ SPVS, relatório técnico, 2008.
- Stehmann, J.R., Forzza, R.C., Salino, A., Sobral, M., Costa, D.P. & Kamino, L.H.Y. (2009). Plantas da Floresta Atlântica. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.
- Sun H.Q., Huang B.Q., Yu X.H., Tian., C.B., Peng Q.X., An D.J. (2017). Pollen limitation, reproductive success and flowering frequency in single-flowered plants. *Journal of Ecology*. **106**, 1.
- Tremblay R.L., Zimmerman J.K., Lebrón, L., Bayman, P. (1998) Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis* (Orchidaceae). *Biological Conservation*. **85**. 297-304.
- Tremblay R.L., Ackerman J., Zimmerman J.K., Calvo R.N. (2005) Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. *Biological Journal Linnean of the Society*. **84**:1-54.

- Tremblay R.L. (2006). The effect of flower position on male and female reproductive success in a deceptively pollinated tropical orchid. *Botanical Journal Linnean Society*. **151**, 405 – 410.
- Tremblay R.L., Zimmerman J.K., Lebrón K., Bayman P., Sastre I., Axelrod F., Alers-García J. (1998). Host specificity and low reproductive success in the rare endemic Puerto Rican orchid *Lepanthes caritensis*. *Biological Conservation*. **85**, 297-304.
- Vandewoestijne S., Róis A.S., Caperta A., Baguete M., Tyteca D. (2009). Effects of individual and population parameters on reproductive success in three sexually deceptive orchid species. *Plant Biology*. **11**, 454-463.
- Vaughton G., Ramsey M., (1998). Floral display, pollinator visitation and reproductive success in the dioecious perennial herb *Wurmbea dioica* (Liliaceae). *Oecologia*. **115**, 93–101.
- Vogel S. (1990) *The role of scent glands in pollination: on the structure and function of osmophores*. New Delhi: Amerind Publishing Company, pp. 218.
- Woodcock T.S., Larson B.M.H., Kevan P. (2014) Flies and Flowers II: Floral Attractants and Rewards. *Journal of Pollination Ecology*, **12**, 63–94.

## Material suplementar

### Título: Quais estratégias reprodutivas influenciam positivamente o sucesso reprodutivo feminino e masculino em Pleurothallidinae (Orchidaceae)?

Autoras: Gabriela Bonfim Ribeiro, Anna Victoria Silvério Righetto Mauad, Camila Silveira Souza, Erika Amano, Eric de Camargo Smidt, Viviane Silva-Pereira

Tabela S1. Espécies e material testemunho das plantas coletadas na Reserva Natural do Patrimônio Particular Nhandara Guaricana e número de acesso do GenBank.

Espécies	Voucher	Número de acesso do GenBank
<i>Acianthera glanduligera</i> (Lindl.) Luer	Ribeiro GB et al. et al. 10	JQ306369
<i>Acianthera luteola</i> (Lindl.) Pridgeon & M.W.Chase	Ribeiro GB et al. et al. 14	KX495754.1
<i>Anathallis adenochila</i> (Loefgr.) F.Barros	Ribeiro GB et al. et al. 15	KC425725
<i>Anathallis microphyta</i> (Barb.Rodr.) C.O.Azevedo & van den Berg	Ribeiro GB et al. et al. 16	MN332355
<i>Barbosella gardneri</i> (Lindl.) Schltr.	Ribeiro GB et al. et al. 11	KX686534
<i>Barbosella miersii</i> (Lindl.) Schltr.	Ribeiro GB et al. et al. 13	KX686535.1
<i>Dryadella zebrina</i> (Porsch) Luer	Ribeiro GB et al. 01	* <i>D. edwallii</i> AF262824.1
<i>Octomeria crassifolia</i> Lidl.	Ribeiro GB et al. et al. 07	KC425813
<i>Pabstiella colorata</i> (Lindl.) Luer	Ribeiro GB et al. 05	* <i>O. grandiflora</i> MK294811
<i>Pabstiella fusca</i> (Lindl.) Chiron & Xim.Bols.	Ribeiro GB et al. 06	JQ306469
<i>Pabstiella parvifolia</i> (Lindl.) Luer	Ribeiro GB et al. 03	MN551442.1
<i>Pabstiella trifida</i> (Lindl.) Luer	Ribeiro GB et al. 04	JQ306390.1
<i>Pabstiella versicolor</i> (Porsch) Luer	Ribeiro GB et al. 09	MN551470.1
<i>Specklinia grobyi</i> (Bateman ex Lindl.) F.Barros	Ribeiro GB et al. 12	KC425796.1
<i>Stelis aprica</i> Lindl.	Ribeiro GB et al. 08	JQ306418.1
<i>Stelis argentata</i> Lindl.	Ribeiro GB et al. 02	JQ306421.1
<i>Stelis papaquerensis</i> Rehb.f.	Ribeiro GB et al. 17	JQ306416.1

Tabela S2. Espécies que foram submetidas aos testes histoquímicos até o momento, respectivamente com seus resultados. Testes para a detecção de proteínas (Comasie Blue Brilliant), osmóforos (vermelho neutro) e amido (lugol). Reação positiva (+); reação negativa (-).

	Peça floral	Osmóforos	Proteínas	Amido
<i>Acianthera glanduligera</i>	Sépalas	?	-	-
	Pétalas	?	-	-
	Labelo	?	-	-
<i>Acianthera luteola</i>	Sépalas	+	+	+
	Pétalas	-	-	-
	Labelo	+	+	+
<i>Anathallis adenochila</i>	Sépalas	+	-	+
	Pétalas	-	-	+

	Labelo	-	-	+
<i>Anathallis microphyta</i>	Sépalas	-	-	-
	Pétalas	-	-	-
	Labelo	+	+	-
<i>Dryadella zebrina</i>	Sépalas	+	+	+
	Pétalas	+	-	+
	Labelo	+	-	+
<i>Pabistiella colorata</i>	Sépalas	+	-	+
	Pétalas	+	-	+
	Labelo	+	-	+
<i>P. fusca</i>	Sépalas	+	-	+
	Pétalas	+	+	+
	Labelo	+	+	+
<i>P. parvifolia</i>	Sépalas	-	+	-
	Pétalas	+	-	-
	Labelo	+	+	-
<i>P. trifida</i>	Sépalas	-	?	+
	Pétalas	-	?	+
	Labelo	+	?	+
<i>P. versicolor</i>	Sépalas	+	-	-
	Pétalas	-	-	-
	Labelo	-	-	-
<i>Specklinia grobyi</i>	Sépalas	+	-	-
	Pétalas	+	-	-
	Labelo	+	+	-
<i>Stelis aprica</i>	Sépalas	+	+	+
	Pétalas	+	-	-
	Labelo	+	-	+
<i>S. argentata</i>	Sépalas	+	-	+
	Pétalas	-	-	+
	Labelo	+	+	+
<i>S. papaquerensis</i>	Sépalas	+	-	-
	Pétalas	-	-	-
	Labelo	-	-	+

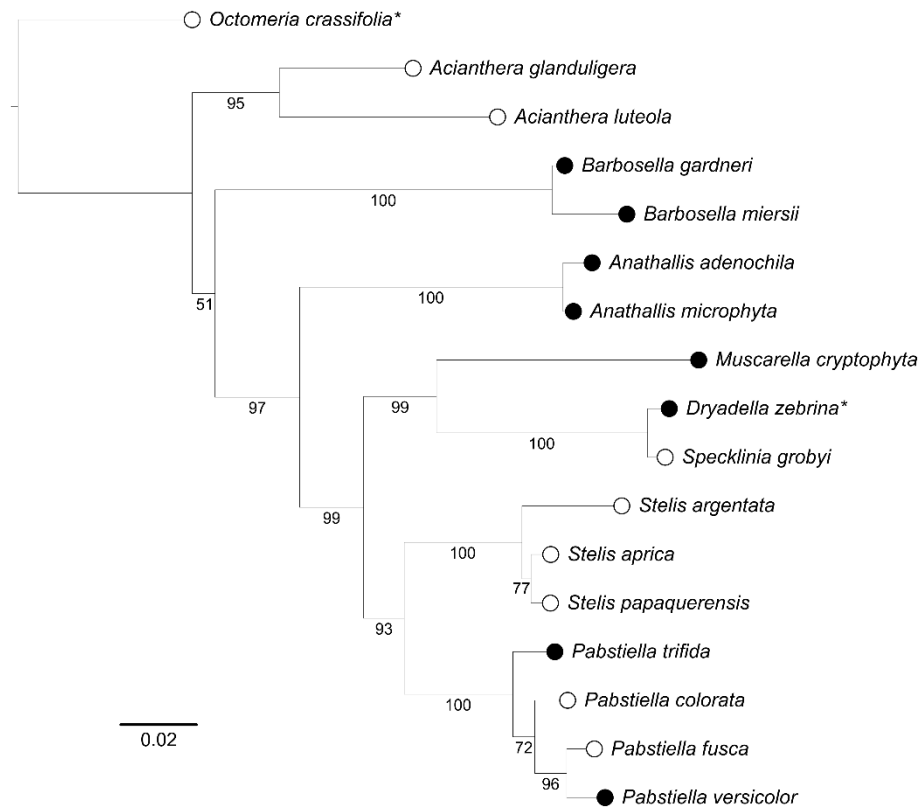


Figura S1. Relações filogenéticas entre as espécies monitoradas. Círculos escuros representam espécies de flores únicas e círculos brancos representam espécies de flores múltiplas.

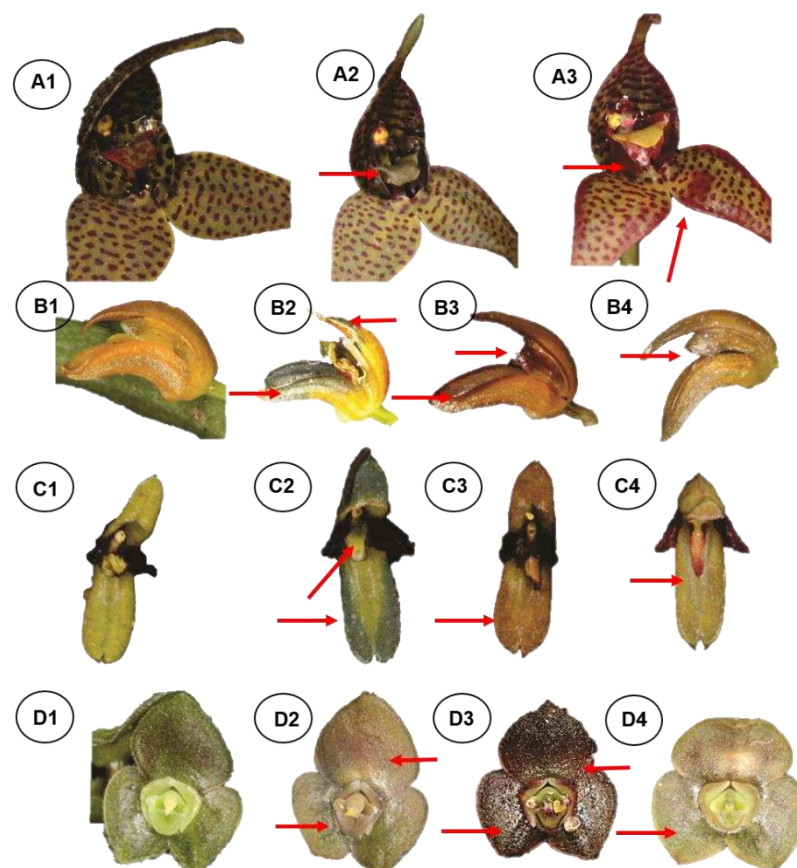


Figura S2. Reação de flores frescas submetidas a testes histoquímicos. A1-A3 *D. zebrina*; A1 controle, A2 pétalas e labelo corados pelo lugol, A3 sépalas, pétalas e labelo corados pelo vermelho neutro; B1-B4 *P. trifida*; B1 controle, B2 pétalas, sépalas e labelo corados pelo lugol, B3 pétalas, sépalas e labelo corados pelo vermelho neutro, B4 pétalas sépalas e labelo corados pelo azul de coomasie; C1-C4 *P. versicolor*; C1 controle; C2 sépalas e labelo corados pelo lugol, C3 sépalas coradas pelo vermelho neutro, C4 sépalas coradas pelo azul de coomasie; D1-D4 *S. papaquerensis*; D1 controle; D2 sépalas, pétalas e labelo corados pelo lugol, D3 pétalas, sépalas e labelo corados pelo vermelho neutro, D4 sépalas e labelo corados pelo azul de coomasie.

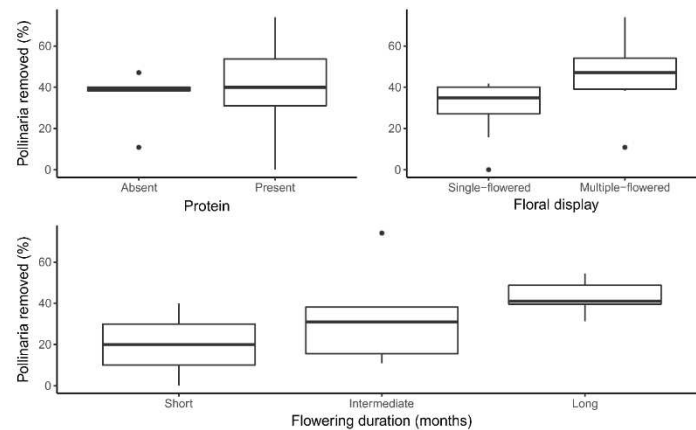


Figura S3. Resultado das análises de GLM excluindo as espécies *Stelis aprica* e *S. papaquerensis*. Efeito positivo da secreção de proteínas, *display floral* de flores múltiplas e duração da floração no sucesso reprodutivo masculino.

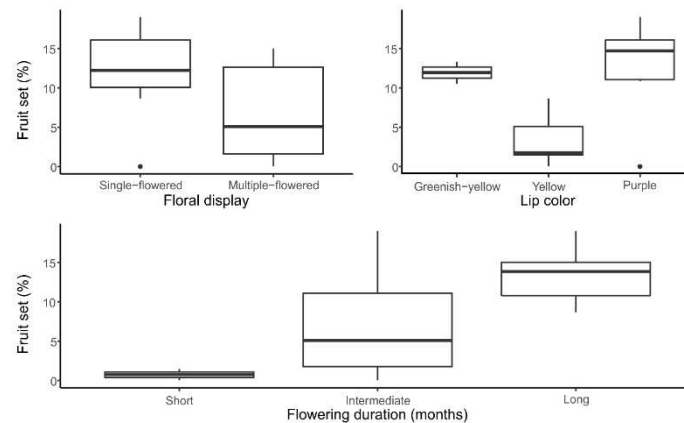


Figura S4. Resultado das análises de GLM excluindo as espécies *Stelis aprica* e *S. papaquerensis*. Efeito positivo do *display floral* de flor única, cor do labelo amarelo esverdeado e duração da floração no sucesso reprodutivo feminino.

Tabela S3. Efeito da presença de proteínas e amido na porcentagem de PPR e PTF nas 15 espécies de orquídeas, analisadas através do GLM.

Preditores	Estimado	PPR			Estimate	PFS		
		Std. Error	z value	P value		Std. Error	z value	P value
Proteína	0,391	0,098	3,986	<b>0.001</b>	0,007	0,096	0,075	0,940
Amido	-0,109	0,092	-1,195	0,232	0,129	0,086	1,495	0,135

Tab. S4. Efeito do *display floral*, duração da floração e cor do labelo na porcentagem de PPR e PTF nas 15 espécies de orquídeas, analisadas através do GLM.

Preditores	Estimate	PPR			Estimate	PFS		
		Std. Error	z value	P value		Std. Error	z value	P value
<i>Display floral</i>	0,553	0,139	3,967	<b>&lt; 0.001</b>	-0,495	0,162	-3,050	<b>0,002</b>
Duração da floração	0,489	0,123	3,991	<b>&lt; 0.001</b>	0,710	0,190	3,744	<b>&lt; 0.001</b>
Cor do labelo	-0,006	0,115	0,056	0,956	0,340	0,115	2,956	<b>0,003</b>

Tabela S5. Espécies que foram observadas com visitantes florais. Os meses e horários de visita e a identificação dos visitantes.

Espécies	Meses de observação	Horários de observação	Visitantes
<i>Acianthera glanduligera</i>	Agosto, setembro (2019)	12h-13h30	Não observado
<i>Barbosella gardneri</i>	Setembro (2019)	12:30h-13:30h	Não observado
<i>Dryadella zebrina</i>	Novembro (2018, 2019)	6h-10h e 8h-10h30	Quatro visitantes se aproximaram, mas não visitaram as flores
<i>Stelis aprica</i>	Setembro (2019)	11h-13h30	Um visitante da família Empididae
<i>S. argentata</i>	Outubro (2019), Janeiro 2020	11h-12h30	Um visitante não identificado
<i>S. papaquerensis</i>	Outubro (2019)	12h-15h	20 visitantes da Família Cecidomyiidae

Em *S. papaquerensis* foram avistadas várias moscas com o mesmo morfotipo sobre as flores. Duas foram coletadas e identificadas sendo da família Cecidomyiidae. Uma das moscas coletadas foi vista forrageando sobre uma das flores. Foi possível ver a probóscide do animal sobre o labelo e pétalas, mas não houve a remoção do polinário (FiguraS5).





Figura S5. Mosca da Família Cecydomiidae sobre a flor de *S. papaquerensis*. No momento da coleta o animal estava forrageando sobre a flor e assim permaneceu na fixação, montagem e registro fotográfico. É possível ver a probóscide (PR) do animal sobre o labelo da flor.

Em *S. aprica* foi vista uma mosca da família Empididae sobre a inflorescência. No momento da observação havia algo semelhante a um polinário na pata posterior do animal, o qual acabou se desprendendo no momento da captura (Figura S6).

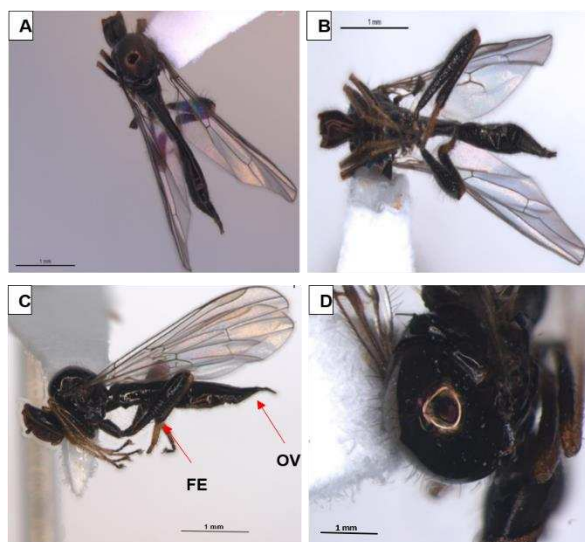


Figura S6. Mosca capturada na inflorescência de *S. aprica*. (A) Vista dorsal da mosca. (B) Vista frontal da mosca. (C) Vista lateral da mosca com destaque para as regiões anatômicas. região do fêmur achatada (FE) indica característica de visitante floral. A estrutura ovipositora (OV) indica que a mosca é uma fêmea da família Empididae. (D) Região da cabeça da mosca.

Em *S. argentata* foi observada uma mosca (não identificada) forrageando rapidamente sobre os botões e as flores que pareciam estar recentemente abertas. Na pata posterior da mosca havia algo semelhante ao estipe do polinário, porém não haviam polínias para que houvesse a confirmação (Figura S7).

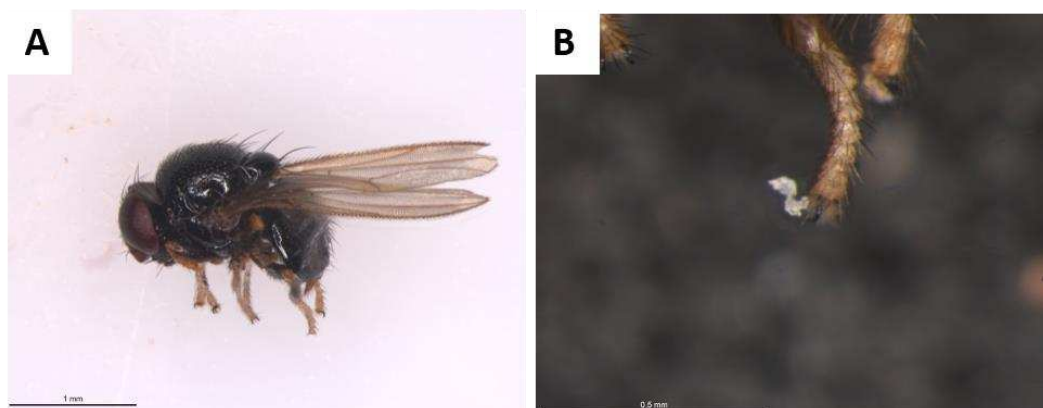


Figura S7. A) Diptera ainda com a família não identificada. B) Vestígio de um possível estipe do polinário na pata traseira do animal.

## CONCLUSÃO

As estratégias reprodutivas descritas neste trabalho foram concernentes com as que já haviam sido descritas na literatura para as outras espécies integrantes da subtribo. Concluímos que a secreção de proteínas, amido e emissão de odores são importantes estratégias de atratividade floral que indicaram estar associados ao sucesso reprodutivo, particularmente da função masculina. Esses recursos parecem ter evoluído em diferentes clados de Pleurothallidinae e ocasionam a maior permanência do polinizador na flor aumentando as chances de que o polinário seja removido de maneira eficiente, e diminuindo as chances de que ocorra falha no processo de polinização.

As características miófilas parecem estar melhor relacionadas ao sucesso reprodutivo masculino, enquanto características sapromiófilas indicar ter relação ao sucesso reprodutivo feminino.

Nossos resultados corroboraram trabalhos na literatura que descrevem o *display floral* com muitas flores como um importante fator para o sucesso reprodutivo de Orchidaceae. Essa estratégia apresentou ser mais eficiente para a função masculina, o que geralmente é comum considerando seleção sexual em plantas onde a função feminina está mais envolvida com a produção de sementes do que de fato com a atração de polinizadores.

Com este trabalho, ampliamos a descrição de flores secretoras de proteínas. Antes na literatura apenas duas eram documentadas, agora descrevemos onze espécies em Pleurothallidinae. Destacamos também a fenologia da floração síncrona de *B. miersii* e *P. colorata*, espécies que dividem o mesmo forófito, cujo florescimento concomitante foi benéfico para o sucesso reprodutivo das duas espécies. Por fim, observamos moscas da família Empididae visitando as flores, essas moscas não haviam sido descritas como polinizadoras e sequer visitantes de Pleurothallidinae e pela primeira vez foram observadas sobre as inflorescências de uma espécie da subtribo.

Os resultados desse estudo pretendem servir como embasamento para outros trabalhos com Orchidaceae, e em especial Pleurothallidinae, nas áreas de ecologia, evolução, anatomia e histoquímica, e com isso, traçar a história natural das espécies e também planejar intervenções que contribuam para estratégias conservacionistas.

## REFERÊNCIAS

- ABELI, T.; JÄKÄLÄNIEMI, A.; WANNAS, L.; MUTIKAINEN, P.; TUOMI, J.; Pollen limitation and fruiting failure related to canopy closure in *Calypso bulbosa* (Orchidaceae), a northern food-deceptive orchid with a single flower. 2013. **Botanical Journal Linnean Society**, v. 171, n. 4, p. 744–750.
- ACKERMAN, J.; Mechanisms and evolution of food-deceptive pollination systems in orchids. 1986. **Lindleyana**. v. 1, p. 108-113.
- ACKERMAN, J. D.; MONTALVO, A. M.; Short- and long-term limitations to fruit production in a tropical orchid. 1990. **Ecology**. v. 7, n. 1, p. 263-272.
- ACKERMAN, J.; ZIMMERMAN, J. K.; 14TH WORLD ORCHID CONFERENCE. **Bottlenecks in the life histories of orchids: resources, pollination, population structure, and seedling establishment**. 1993.
- AGUIAR, J. M. R. V. B.; PANSARIN, E. R.; Deceptive pollination of *Ionopsis utricularioides* (Oncidiinae: Orchidaceae). 2018. **Revista Elsevier**. v. 250, p. 72-78.
- ALBORES-ORTIZ, O.; SOSA, Y.; Polinizacion de dos especies simptricas de stelis (pleurothallidinae, orchidaceae). 2006. **Acta Botanica Mexicana**. n. 74.
- ARÉVOLO-RODRIGUES G., BARROS F., DAVIS A. R.; CARDOSO-GUSTAVSON, P. Floral glands in myophyllus and sapromyophyllus species of the Pleurothallidinae (Epindendroidae, Orchidaceae) – osmophores, nectaries, and a unique sticky gland. 2021. **Protoplasma**. DOI: 10.1007/s00709-021-01624-2.
- BARBOSA, A.; MELO, M. C.; BORBA, E.; Self-incompatibility and myophily in *Octomeria* (Orchidaceae, Pleurothallidinae) species. 2009. **Plant Systematics Evolution**. v. 283, n. 1, p. 1-8.
- BLANCO, M. A.; BARBOZA, G.; Pseudocopulatory pollination in *Lepanthes* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by fungus gnats. 2005. **Annals of Botany**. v. 95, n. 5, p. 763-772.
- BOGARÍN, D.; FERNÁNDEZ, M.; BORKENT, A.; HEEMS, KERK, A.; PUPULIN, F.; RAMÍREZ, S.; SMETS, E.; GRAVENDEEL, B.; Pollination of *Trichosalpinx* (Orchidaceae: Pleurothallidinae) by biting midges (Diptera: Ceratopogonidae). 2018. **Botanical Journal Linnean Society**. v. 186, n. 4, p. 510–543.

BOGARÍN, D.; FERNÁNDEZ, M.; PUPULIN, F.; PÉREZ-ESCOBAR, A.; KARREMANS, A. P.; KRUIZINIGA, J.; SMETS, E.; GRAVENDEEL, B.; Phylogenetic comparative methods improve the selection of characters for generic delimitations in a hyperdiverse Neotropical orchid clade. 2019. **Scientific Reports**. v. 9, n. 15098.

BORBA, E. L.; SEMIR, J.; Pollinator Specificity and Convergence in Fly-pollinated *Pleurothallis* (Orchidaceae) Species: A Multiple Population Approach. 2001. **Annals of Botany**. v. 88, p. 75-88.

BORBA, E. L., BARBOSA, A., MELO, C. M., GONTIJO, S. M. Mating systems in the Pleurothallidinae (Orchidaceae): evolutionary and systematic implications. 2011. **Lankesteriana**. 11, 207-221.

CAPÓ, M.; CURSACH, J.; RITA, J. Disentangling the pollination system of the food-deceptive orchid *Anacamptis longicornu* (Orchidaceae): from breeding system to spatio-temporal variation in reproductive success. 2020. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**. v. 154, n. 3.

CARADONNA, P. J.; ACKERMAN J. D. Reproductive assurance for a rewardless epiphytic orchid in Puerto Rico *Pleurothallis ruscifolia* (Orchidaceae, Pleurothallidinae). 2010. **Caribbean Journal of Science**. v. 46, p. 249–257.

CARDOSO-GUSTAVSON P., SOUZA, S. R., BARROS, F. Floral volatile profile in Pleurothallidinae, an orchid subtribe pollinated by flies: ecological and phylogenetic considerations. 2017. **Phytochemistry Letters**. v. 22, p. 49-55.

COLEMAN, E.; POUYANNE, A.; Pollination of *Cryptostylis leptochila*. 1928. **Victorian Naturalist**. v. 44, p. 333 – 340.

COZZOLINO, S.; WIDMER, A.; Orchid diversity: an evolutionary consequence of deception. 2005. **Trends ecological evolution**. v. 20, n. 9, p. 487.

CHRISTENSEN, D. E.; **Fly pollination in the Orchidaceae.**In **Orchid biology: reviews and perspectives**. 1994. New York: Editora Arditti, v. 6, p. 415—454.

DAVIES, K.L.; STPICZYŃSKA, M. Comparative labellar anatomy of resin-secreting and putative resin-mimic species of *Maxillaria* s.l. (Orchidaceae: Maxillariinae). 2012. **Botanical Journal Linnean Society** v. 170, p. 405-435.

DAVIES, K. L., STPICZYNSKA, M. Labellar anatomy and secretion in *Bulbophyllum* Thouars (Orchidaceae: Bulbophyllinae) sect. Racemosae Benth. & Hook. f. 2014. **Annals of Botany**. v. 114, n. 5, p.889-911.

DORMONT, L., DELLE-VEDOVE. R., SCHATZ, B. J. M., BESSIÈRE, J-M, KEY, M. H. Rare white-flowered morphs increase the reproductive success of common purple morphs in a food-deceptive orchid. 2010. **New Phytologist** v. ;185, n. 1, p. 300-310.

DRESSLER R. L.; The orchids—natural history and classification. 1981. **Taxon**. v. 6, n. 3, p. 48-60.

EHLERS, B. K.; OLESEN, J. M.; AGREN, J.; Floral morphology and reproductive success in the orchid *Epipactis helleborine*: regional and local across-habitat variation. 2002. **Plant Systematic Evolution**. v. 236, p. 19-32 pp.

ENDARA, L; GRIMALDI, D; ROY, B. A.; Lord of the flies: pollination of *Dracula orchids*. 2010. **Lankesteriana**, v. 10, p. 1—11.

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL. L.; **Principles of pollination ecology**. 3 ed. London: Pergamon Press. 1979.

FRANCISCO, A.; ASCENÇÃO, L. Structure of the Osmophore and Labellum Micromorphology in the Sexually Deceptive Orchids *Ophrys bombyliflora* and *Ophrys tenthredinifera* (Orchidaceae). 2013.**International Journal of Plant Sciences**. v. 174, n. 4, p. 619-636.

FRITZ A. L. Deceit pollination of *Orchis spitzelii* (Orchidaceae) on the Island of Gotland in the Baltic: a suboptimal system. 1990. **Nordic Journal of Botany**. v. 9, p. 577–587.

FRITZ, A. L.; NILSSON, A.Reproductive Success and Gender Variation in Deceit-Pollinated Orchids. 1996. **Floral Biology**. p. 319-338.

GALIZIA, C. G.; KUNZE, J.; GUMBERT, A.; BORG-KARLSON, A. K.; SACHSE S.; MARKL, C.; MENZEL, R. Relationship of visual and olfactory signal parameters in a food-deceptive flower mimicry system. 2005. **Behavioural Ecology** v. 16, n.1 p.159–168.

GASKET, A. C.; Floral shape mimicry and variation in sexually deceptive orchids with a shared pollinator. 2012. **Biological Journal Linnean of the Society**. v. 106, p. 469-481.

GRAJALES-CONESA, J.; MELÉNDEZ-RAMÍREZ, V.; CRUZ, L.; Aromas florales y su interacción con los insectos polinizadores. 2001. **REVISTA MEXICANA DE BIODIVERSIDAD**. v. 82, n. 4, p. 1356-1367.

GROSS, K.; SCHIESTL, F. P.; Are tetraploids more successful? Floral signals, reproductive success and floral isolation in mixed-ploidy populations of a terrestrial orchid. 2015. **Annals Botany**. v. 115, n. 2, p. 263-273.

HEINRICH, B.; Bee flowers: a hypothesis on flower variety and blooming times. 1975. **Evolution**, v. 29, p. 325-334.

INTERNICOLA, A. I.; JULIET, N.; SMITHSON, A.; GIGORD, L. D. Experimental investigation of the effect of spatial aggregation on reproductive success in a rewardless orchid. 2006. **Oecologia**. v. 150, n. 3, p. 435-441.

JERMAKOWICZ, E.; OSTROWIECKA, B.; TALALAJ, I.; PLISZO, A. Male and female reproductive success in natural and anthropogenic populations of *Malaxis monophyllos* (L.) Sw. (Orchidaceae). 2015. **Biodiversity: Research and Conservation**. v. 39, n. 1, p. 37-44.

JERSÁKOVÁ, J.; JOHNSON S. D.; KINDLMANN, P. Mechanisms and Evolution of deceptive pollination in orchids. 2006. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**. v. 81, n. 2, p. 219-235.

JERSÁKOVÁ, J.; JOHNSON, S. D.; PUPIN, A. C.; KINDLMANN, P. Effect of nectar supplementation on male and female components of pollination success in the deceptive orchid *Dactylorhiza sambucina*. 2008. **Acta Oecologica**. v. 33, n. 3, p. 300-306.

JOHNSON, S. D.; Evidence for Batesian mimicry in a butterfly-pollinated orchid. 1994. **Biological Journal. Linnean of Society**. v. 53, n. 1, p. 91-104.

JOHNSON, S. D.; STEINER, K. E.; Generalization versus specialization in plant pollination systems. 2000. **Trends in Ecology & Evolution**. v. 15, n. 4, p. 140-143.

JUILLET, N.; GONZALES, M. A.; PAGE, P. A.; GIGORD, L. B. A.; Pollination of the European food-deceptive *Traunsteinera globosa* (Orchidaceae): the importance of nectar-producing neighbouring plants. 2007. **Plant Systematics Evolution**. v. 265, p. 123-129.

KARREMANS, A. P.; PUPULIN, F.; GRIMALDI, D.; BEENTJES, K. K.; BUTÔT, R., FAZZI, G. E.; KASPERS, K.; KRUIZINGA, J.; ROESSINGH, P.; SMETS, F.; GRAVENDEEL, B. Pollination of *Specklinia* by nectar-feeding *Drosophilla*: the first reported case of a deceptive syndrome employing aggre.: 2015. **Lankesteriana**. v. 16, n.2, p. 437-55.

KARREMANS A. P.; Genera Pleurothallidinarum: an updated phylogenetic overview of pleurothallidinae. 2016. **Lankesteriana**. 16:2. 219-241.

KARREMANS, A. P.; DIAZ-MORALES, M.; CONFERENCE PAPERS: SYSTEMATICS. The pleurothallidinae: extremely high speciation driven by pollinator adaptation. p. 363-388, 2019.

KINDLMANN, P.; JERKÁSOVÁ, J.; Effect of floral display on reproductive success in terrestrial orchids. 2006. **Folia geobotânica**. v. 41, p. 47-60.

LI, P., ZHENG, G., DAFNI, A., LUO, Y. Reproductive biology of an alpine orchid *Phaius delavayi*. 2010. **Plant Systematics Evolution**. v. 286, p. 167–173.

LI, P., HUANG, B. Q., PEMBERTON, R. W., LUO, Y. B., CHENG, J. Floral display influences male and female reproductive success of the deceptive orchid *Phaius delavayi*. 2011. **Plant Systematics Evolution**. v. 296, p. 21-27.

MELO, M. C.; BORBA, E.; PAIVA, E. A. S.; Morphological and histological characterization of the osmophores and nectaries of four species of Acianthera (Orchidaceae: Pleurothallidinae). **Plant Systematics and Evolution**. v. 286, n. 3, p. 141-151.

MILLNER, H.; BALDWIN, T. Floral micromorphology of the genus *Restrepia* (Orchidaceae) and the potential consequences for pollination. **Flora - Morphology Distribution Functional Ecology of Plants**. v. 225, p10-19.

MORALES, N. G., TOSCANO DE BRITO, A. L. V., MAUAD A. V. S. R., SMIDT E., C. Molecular phylogeny and biogeography of Pabstiella (Pleurothallidinae: Orchidaceae) highlight the importance of the Atlantic Rainforest for speciation in the genus. 2020. **Botanical Journal Linnean Society**, XX, 1-20.

MORELLATO, L. P. C., LEITÃO-FILHO, H. F.; **Padrões de frutificação e dispersão na Serra do Japi. In História natural da Serra do Japi: ecologia e preservação de uma área florestal no Sudeste do Brasil**. Editora Unicamp/Fapesp, Campinas, p. 112-140. 1992.

NEILAND, M. R. M.; WILCOCK, C. C.; Fruit set, nectar reward, and rarity in the Orchidaceae. 1998. **American Journal of Botany**. v. 85, n.12, p. 1657-1671.

NILSSON, L. A. Orchid pollination biology. *Trends in Ecology & Evolution*. 1992. 7 255-259.

PANSARIN, E. R; PANSARIN, L. M; MARTUCCI, M. E. P. NETO, L; Self compatibility and specialisation in a fly—pollinated *Acianthera* (Orchidaceae: Pleurothallidiinae). 2016. **Journal of Botany**, v. 64, p.359—367.

PAPADOULOS, A. S. T.; POWEL, M. P.; PUPULIN, F.; WARNER, J.; HAWKINS, J. A.; SALAMIN, N.; CHITKKA, L.; WILLIAMS, N. H.; WHITTEN, W. N.; LOADER, D.; VALENTE, L. M.; CHASE, M. W.; SALOVAINEN, V.; Convergent evolution of floral signals underlies the success of Neotropical orchids. 2013. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** v. 280, n. 1765.

PARRA-TABLA, V.; VARGAS, C.; Phenology and Phenotypic Natural Selection on the Flowering Time of a Deceit-pollinated Tropical Orchid, *Myrmecophila christinae*. 2004. **Annals of Botany**, v. 94, n. 2, p. 243-250.

PEAKALL, R.; HANDEL, S. N. Pollinators discriminate among floral heights of a sexually deceptive orchid: implications for selection. 1993. **Evolution**. v.47, n. 6, p. 1681-1687.

PELLEGRINO, G.; BELLUSCI, F.; MUSACCHIO, A. The effects of inflorescence size and flower position on female reproductive success in three deceptive orchids. 2005. **Plant Botanical Studies**. v. 51, n. 3, p. 351 – 356.

POLICHA, T.; GRIMALDI, D. A.; DAVIS, A.; BARNADAS, M.; DENTINGER, B. T. M.; RAGUSO, R. A.; ROY, B. A. Disentangling visual and olfactory signals in mushroom-mimicking *Dracula* orchids using realistic three-dimensional printed flowers. 2016. **New Phytologist**. v. 210, n. 3, p. 1058-71.

POUYANNE, A.; **La fécondation des Ophrys par les insectes. Bulletin de la Société d'Histoire Naturelle de l'Afrique du Nord**. v. 8, n. 6–7. 1917.

PRIDGEON, A. M.; SOLANO, R.; CHASE, M. W.; PHYLOGENETIC RELATIONSHIPS IN PLEUROTHALLIDINAE (ORCHIDACEAE): COMBINED EVIDENCE FROM NUCLEAR AND PLASTID DNA SEQUENCES1. Cidade do México. 2001. **American Journal of Botany**. v. 88, n. 12, p: 2286-2308.



RECH, A. R.; AGOSTINI, K.; OLIVEIRA, P. E. MACHADO, I. C.; **Biologia da polinização**. Rio de Janeiro- RJ: Projeto Cultural.p. 328-341, 2014.

SALZMANN, C. C.; COZZOLINO, S.; SCHIESTL, F. P. Floral Scent in Food-Deceptive Orchids: Species Specificity and Sources of Variability. 2007. **Plant Biology**. v. 9, n. 6,p. 720-729.

SCHIESTL, F. P.; On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. 2005. **The Science of Nature**. v. 92, n. 6, p. 255-264.

SCHEMSKE, D. W.; Evolution of floral display in the orchid *Brassavola nodosa*. 1980. **Evolution**. v. 34, p. 489–493.

SHRESTHA, M.; DYER, A. G.; DORIN, A.; REN, Z. X.; BURD, M.; Rewardlessness in orchids: how frequent and how rewardless? 2020. **Plant Biology**. v. 22, n. 4, p. 555-561.

SCHOEN, D. J.; CLEGG, M. T. The influence of flower color on outcrossing rate and male reproductive success in *Ipomoea purpurea*. 1985. **Evolution** v. 39, p. 1242–1249.

SILVA-PEREIRA, V.; SMIDT, E. C.; BORBA, E. L. Isolation mechanisms between two sympatric *Sophranitis* (Orchidaceae) species endemic to Northeastern Brazil. 2007. **Plant Systematics Evolution**. v. 269, p. 171-182.

SINGER, R. B.; COCCUCI, A. A. Pollination mechanism in four sympatric southern Brazilian Epidendroidae orchids. 1999. **Plant Physiology**. v. 14, p. 47-56.

SLETVOLD, N.; AGREN, J.; Nonadditive effects of floral display and spur length on reproductive success in a deceptive orchid. 2011. **Ecology Ecological Society of America**. v. 92, n.12,2162-2174.

SMIDT, E. C.; SILVA-PEREIRA, V.; BORBA, E. L. Reproductive biology of two *Cattleya* (Orchidaceae) species endemic to North-eastern Brazil. 2006. **Plant Species Biology** v. 21, p. 85-91.

SPRENGEL, C. K.; Das Entdeckte Geheimniss in der Natur im Bau und in der Befuchtung der Blumen. Berlin, Friedrich Vieweg dem aeltern. 1793. In: SCHIESTL, F. P.; On the success of a swindle: pollination by deception in orchids. 2005. **The Science of Nature**. v. 92, n. 6, p. 255-264.

SMITHSON, A.; GIGORD, L. D. B. Are there fitness advantages in being a rewardless orchid? Reward supplementation experiments with *Barlia robertiana*. 2001. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 268 (1475):1435-1441.

STÖKL, J.; BRODMANN, J.; DAFNI, A.; AYASSE, M.; HANSSON, B. Smell like apids: orchid flowers mimic aphid alarm pheromones to attract hoverflies for pollination. 2010. **Proceedings of the Royal Society** v. 278, n. 1709, p. 1216-22.

SRIMUANG, K. WATTHANA, S. HENRIK Æ. P.; RANGSAYATORN, N.; EUNGWANICHAYAPANT, P. D.; Flowering Phenology, Floral Display and Reproductive Success in the Genus *Sirindhornia* (Orchidaceae): A Comparative Study of Three Pollinator-Rewarding Species. 2010. **Annales Botanici Fennici**, v. 47, n. 6, p. 439-448.

STEHMANN J. R., FORZZA R. C., SALINO A., SOBRAL, M., COSTA, D P., KAMINO, L. H. Y.; **Plantas da Floresta Atlântica. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro.** 2009. 115-120.

STREINZER, M.; ELLIS, T.; PAULUS, H. F.; SPAETHE, J.; Visual discrimination between two sexually deceptive *Ophrys* species by a bee pollinator. 2009. **Arthropod Plant Interaction**. v. 4, p. 141-148.

SUN, H. Q.; HUANG, B. Q.; YU, X. H.; TIAN, C. B.; PENG, Q. X.; AN, D. J. Pollen limitation, reproductive success and flowering frequency in single-flowered plants. 2017. **Journal of Ecology**. v. 106, n.1, p. 19-30.

**THE PLANT LIST.** Disponível em <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em 10/12/2020.

TREMBLAY, R. L.; ACKERMAN, J.; ZIMMERMAN, J. K.; CALVO, R. N.; Variation in sexual reproduction in orchids and its evolutionary consequences: a spasmodic journey to diversification. 2005. **Biological Journal of Linnean Society**. v. 84 n. 1, p.1-54.

TREMBLAY, R. L.; The effect of flower position on male and female reproductive success in a deceptively pollinated tropical orchid. 2006. **Botanical Journal of the Linnean Society**. v. 3, p. 405-410.

TRUNSCHKE, J.; SLETVOLD, N.; AGREN, J.; The independent and combined effects of floral traits distinguishing two pollination ecotypes of a moth-pollinated orchid. 2019. **Ecology and Evolution**. v. 9, n. 3, p. 1191-1201.

ZHOU, X.; LIANG, Q.; HAN, J. Y.; GAO, J.; Different pollinator assemblages ensure reproductive success of *Cleisostoma linearilobatum* (Orchidaceae) in fragmented holy hill forest and traditional tea garden. 2016. **Scientific Reports**. v. 6, n. 21435.